

Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Ruchholtz)
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort
Marburg

**Entwicklung und Etablierung eines auf sekundären, murinen
Osteoblasten und Fibroblasten beruhenden Co-Kultur-Modells zur
genomischen Analyse von Wachstums- und Differenzierungs-
faktoren und Evaluierung dieser neuen Methode am Beispiel des
Bone Morphogenetic Proteins 7**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin



dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Michael Pado, geb. Benölken

geboren am 25.08.1983 in Ahaus

Böblingen, 2019

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am:

28.11.2019

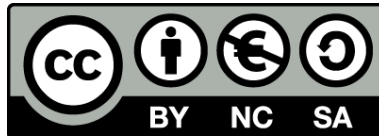
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. Philipp Lechler

1. Korreferent: Prof. Dr. med. Ralf Kinscherf

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Meiner Familie gewidmet.

Zusammenfassung

Die Verletzungen der Kreuzbandstrukturen des Kniegelenkes nehmen eine zentrale Bedeutung in der Orthopädie und Unfallchirurgie ein und weisen aufgrund der hohen Inzidenz eine sozioökonomische Relevanz auf. Eine operative Versorgung der vorderen Kreuzbandruptur wird vor allem bei Instabilitäten des Kniegelenkes durchgeführt, um Folgeschädigungen wie beispielsweise sekundäre Meniskusläsionen oder die Entwicklung einer posttraumatischen Gonarthrose zu vermeiden.

Trotz der kontinuierlichen Optimierung der operativen Versorgung nach Ruptur des vorderen Kreuzbandes zeigen sich weiterhin hohe Re-Ruptur-Raten, welche einerseits durch noch unzureichende OP-Techniken und ungenügende Patienten-Compliance und andererseits durch biologisches Transplantatversagen zustande kommen. In diesem Zusammenhang stellen die komplexen biologischen Prozesse (Inflammation, Reparatur, Remodelling) der Knochen-Sehnen-Integration einen wichtigen Forschungsschwerpunkt dar, um die mangelhafte Transplantat-Einheilung zu verstehen und letztendlich die zeitgerechte und stabile ossäre Inkorporation von Sehnen-Transplantaten zu gewährleisten.

In diesem Zusammenhang nehmen mit den Osteoblasten und Fibroblasten zwei Zelltypen eine zentrale Rolle im Prozess der ossären Sehnen-Integration und der Bildung extrazellulärer Knochen- und Sehnen-Matrix ein. Dabei legen zahlreiche Studien die Vermutung nahe, dass osteoinduktive Substanzen wie beispielsweise das Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP7), welches sich bereits zur Behandlung von aseptischen Pseudarthrosen etabliert hat, die Knochen-Sehnen-Integration positiv beeinflussen. Unklar verbleiben jedoch weiterhin die molekularbiologischen und zellbiologischen Abläufe im Bereich des Knochen-Sehnen-Übergangs und die spezifischen Wirkungsmechanismen besagter osteoinduktiver Proteine.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, ein standardisiertes Co-Kultur-Modell zur Simulation und Erforschung der Interaktion von Osteoblasten und Fibroblasten aufzubauen und damit eine kontrollierte Analyse der spezifischen Effekte einmaliger und multipler Stimulation mit BMP7 auf die Knochen-Sehnen-Einheilung zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Studie konnte ein standardisiertes, an Wang *et al.* (2007) angelehntes *in vitro* Co-Kultur-Modell, bestehend aus sekundären osteoblastischen und fibroblastischen Zellen muriner Herkunft in einem temporären Zwei-Kammer-Kultivierungs-System, etabliert werden, welches sich durch eine einfache Handhabung auszeichnet und als

Hochdurchsatz-Verfahren eingesetzt werden kann. In diesem Modell diente eine Agarose-Trennschicht zur vorübergehenden Separation der zuvor genannten Zellen, wobei die Entfernung der Trennschicht die Interaktion der beteiligten Zelllinien ermöglichte. Beruhend auf diesem Modell wurden die Auswirkungen einer einfachen und einer mehrfachen Stimulation der osteoblastischen und fibroblastischen Zellen mit rekombinantem humanen BMP7 (rhBMP7) untersucht und die Ergebnisse hinsichtlich statistisch signifikanter Veränderungen ausgewertet.

Histologisch zeigte sich in dieser Studie einerseits eine dosisabhängige und andererseits eine von der Anzahl der Stimulationen abhängige förderliche Wirkung der rhBMP7-Applikation. Es konnte mikroskopisch nachgewiesen werden, dass durch die rhBMP7-Hinzugabe eine beschleunigte Migration und Proliferation der osteoblastischen und fibroblastischen Zellen in die Interaktions-Zone resultierte.

Diese Beobachtungen deckten sich mit den Ergebnissen der in dieser Studie durchgeführten molekularbiologischen Analysen spezifischer Markergene der Osteogenese. Über qRT-PCR konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine rhBMP7-Stimulation eine dosisabhängige Steigerung der Alp1-, Col1a1- und Bglap-Genexpression in den osteoblastischen Zellen im Sinne einer gesteigerten Knochenmatrix-Bildung bewirkte. Eine in der Literatur beschriebene Spp1-Genexpressions-Verstärkung in den osteoblastischen Zellen konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Für die fibroblastischen Zellen zeigte sich durch die rhBMP7-Stimulation eine erhöhte Runx2-, Col1a1-, Alp1-, und Bglap-Genexpression. Diese Resultate legten erstaunlicherweise nahe, dass die fibroblastischen Zellen osteogene Eigenschaften ausbilden beziehungsweise annehmen und damit eine Transdifferenzierung zu funktionsfähigen Osteoblasten durchlaufen.

Die in dieser Studie präsentierten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Knochen-Sehnen-Integration vor allem dadurch zustande kommt, dass in der Kontaktzone zwischen Sehnen- und Knochengewebe einerseits die Osteoblasten vermehrt Knochenmatrix bilden und andererseits die Fibroblasten zu Osteoblasten transdifferenzieren um Knochenmatrix auszubauen und um das Sehnengewebe dadurch ossär zu integrieren.

Da viele der molekularbiologischen und zellbiologischen Abläufe der Knochen-Sehnen-Einheilung noch unklar verbleiben, bedarf es weiterer Untersuchungen zur Generierung eines besseren Verständnis für die Prozesse der ossären Sehnen-Integration und zur Entwicklung von therapeutischen Ansätzen.

Abstract

Lesions of the crucial ligaments of the knee joint play an eminent role in the field of orthopaedics and traumatology. Their high incidence makes them highly socio-economically relevant. Surgical treatment of tears of the anterior crucial ligament is required especially when instability occurs. This can prevent possible subsequent damages such as secondary meniscal lesions or posttraumatic gonarthrosis.

Despite the continuous optimization of the surgical treatment after tears of the anterior crucial ligament, rerupture rates are still high. These are caused by inadequate surgical technique, insufficient patient compliance and also to failure of the biological integration of the transplant. In this context, complex biological processes (inflammation, reparation, remodelling) of the bone-tendon integration form a central research focus. This can help to better understand incorrect or poor transplant incorporation and to ensure a stable and quick bone-tendon-healing.

Osteoblasts and fibroblasts play an important role in the process of osseous tendon integration and the formation of extracellular bone or tendon matrix. In this context, numerous studies suggest that osteoinductive substances such as bone morphogenetic protein-7 (BMP7) – which is already approved in the treatment of aseptic pseudoarthrosis – have a positive impact on bone-tendon healing. Yet, the cell biological and molecular biological processes during bone-tendon transition and specific effects of osteoinductive proteins remain unclear.

The intention of this thesis was to establish a standardized co-culture model to simulate and investigate the osteoblast-fibroblast interaction. This new method was then applied to analyse the specific effect mechanisms of singular and repetitive stimulation with BMP7 on the bone-tendon healing.

Based on the work of Wang *et al.* (2007), a standardized *in vitro* co-culture model was successfully established. It consists of secondary murine osteoblast and fibroblast cells incubated in a temporary two-chamber system. More precisely, an agarose divider served as a transient separator of osteoblastic and fibroblastic cells. After the removal of the divider direct interactions of both cell types were possible. Based on this model, the effects of singular and multiple stimulation of the osteoblastic and fibroblastic cells with recombinant human BMP7 (rhBMP7) were examined and analyzed to spot statistically significant changes. The study has shown that the established method provided an easy handling and

at the same time showed that the co-culture model could be used as a high-throughput technique.

Subsequently the histological analysis of the study showed a dose-dependent and number-dependent effect of the stimulation with rhBMP7. Hence, an accelerated migration and proliferation of the osteoblastic and fibroblastic cells after rhBMP7 application could be observed in the microscopical experiments. These observations were consistent with the results of the molecular biological examinations of specific osteogenic marker genes. Using qRT-PCR, you can see that stimulation with rhBMP7 leads to a dose-dependent increase of *Alp1*, *Col1a1* and *Bglap* gene expressions in osteoblasts as well as an improved formation of bone matrix. An enhanced *Spp1* gene expression as proposed in the common literature was not detectable for the osteoblastic cells in this study. The rhBMP7 application showed an increased gene expression for *Runx2*, *Col1a1*, *Alp1* and *Bglap* in the examined fibroblastic cells. Surprisingly suggesting a transdifferentiation of fibroblasts into functional osteoblasts with developing osteoblast specific characteristics.

The results of this study indicate that the bone-tendon integration on the one hand is achieved by enhanced bone matrix building of the osteoblasts and on the other hand by transdifferentiation of fibroblasts to functional osteoblastic cells. It seems that both cell types are responsible for the incorporation of tendon tissue into bone tissue including the formation of surrounding bone matrix.

Since many cell biological and molecular biological processes of the bone-tendon integration remain unclear, further studies are required to generate a comprehensive understanding for the integration of tendons to bone and to ensure the development of reliable therapeutic approaches.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Allgemein	1
1.2 Anatomie und Biologie des Kniegelenkes	2
1.2.1 Knöcherne Strukturen	2
1.2.2 Kapselapparat	3
1.2.3 Menisken	4
1.2.4 Ventraler Bandapparat	5
1.2.5 Dorsaler Bandapparat	5
1.2.6 Lateraler und medialer Bandapparat	6
1.2.7 Kreuzbandapparat	7
1.2.8 Muskelapparat	8
1.2.9 Blutversorgung und Innervation	9
1.3 Biomechanik des Kniegelenkes	11
1.3.1 Grundlagen der Biomechanik und Gelenkführung	11
1.3.2 Gelenkkinetik und Gelenkkräfte	13
1.3.3 Gelenkkinematik und Gelenkbewegung	15
1.4 Verletzungen des vorderen Kreuzbandes	18
1.4.1 Epidemiologie und Inzidenz	18
1.4.2 Verletzungsmechanismus und Risikofaktoren	19
1.4.3 Diagnostik der VKB-Ruptur	23
1.4.4 Therapie der VKB-Ruptur	27
1.4.5 Komplikationen nach operativer VKB-Versorgung	33
1.4.6 Knochen-Sehnen-Integration und Transplantat-Inkorporation	35
1.4.7 An der Knochen-Sehnen-Integration beteiligte Zellen	39
1.5 Bone Morphogenetic Proteins	43
1.5.1 TGF- β -Superfamilie	43
1.5.2 BMP-Subfamilie	44
1.5.3 BMP-Rezeptoren, BMP- und Smad-Signaltransduktion	45
1.5.4 BMP7	49
1.6 Vorarbeiten, Zielsetzung und Versuchsaufbau	53
1.6.1 Vorherige Vorarbeiten und Untersuchungen	53
1.6.2 Fragestellung und Zielsetzung	54
1.6.3 Studien-Aufbau und konzeptionelle Versuchsplanung	55
1.6.4 Veröffentlichte Publikationen	64

2. Material und Methoden	66
2.1 Materialien, Chemikalien, Geräte	66
2.1.1 Chemikalien, Plastikwaren und allgemeine Reagenzien	66
2.1.2 Geräte	66
2.1.3 Zelllinien	67
2.1.4 Enzyme und Kits	69
2.1.5 Oligonukleotide	69
2.2 Zellbiologische Methoden	72
2.2.1 Zelllinien-Kultivierung	72
2.2.2 Zelllinien-Passagierung	73
2.2.3 Zell-Präparation und -Quantifikation	74
2.2.4 Vorbereitung der Co-Kultivierung	75
2.2.5 Co-Kultivierung und rhBMP7-Stimulation	77
2.3 Molekularbiologische Methoden	81
2.3.1 Extraktion und Purifikation genomischer RNA	81
2.3.2 Photometrische Quantifikation genomischer RNA	82
2.3.3 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese	84
2.3.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	87
2.4 Software	91
2.4.1 Software zur statistischen Auswertung	91
2.4.2 Software zur Daten- und Ergebnis-Präsentation	92
2.5 Mikroskopie	93
3. Ergebnisse	94
3.1 Die Runx2-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	96
3.1.1 Die bereichsabhängige Runx2-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	96
3.1.2 Die zeitabhängige Runx2-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	98
3.1.3 Die dosisabhängige Runx2-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	101
3.2 Die Col1a1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	106
3.2.1 Die bereichsabhängige Col1a1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation ...	106
3.2.2 Die zeitabhängige Col1a1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	108
3.2.3 Die dosisabhängige Col1a1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	111
3.3 Die Alp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	117
3.3.1 Die bereichsabhängige Alp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	117
3.3.2 Die zeitabhängige Alp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	119
3.3.3 Die dosisabhängige Alp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	122

3.4 Die Spp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	128
3.4.1 Die bereichsabhängige Spp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	128
3.4.2 Die zeitabhängige Spp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	130
3.4.3 Die dosisabhängige Spp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	133
3.5 Die Bglap-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	138
3.5.1 Die bereichsabhängige Bglap-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	138
3.5.2 Die zeitabhängige Bglap-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	140
3.5.3 Die dosisabhängige Bglap-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	143
3.6 Die histologischen Veränderungen nach rhBMP7-Stimulation	150
4. Diskussion	155
4.1 Die Runx2-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	155
4.2 Die Col1a1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	159
4.3 Die Alp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	162
4.4 Die Spp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	165
4.5 Die Bglap-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation	167
4.6 Die histologischen Veränderungen nach rhBMP7-Stimulation	170
4.7 Methoden-Etablierung und Zusammenfassung der rhBMP7-Wirkung	172
5. Ausblick	177
6. Tabellenverzeichnis	181
7. Abbildungsverzeichnis	183
8. Abkürzungsverzeichnis	186
9. Literaturverzeichnis	189
10. Anhang	206
11. Tabellarischer Lebenslauf	293
12. Verzeichnis der akademischen Lehrer	295
13. Danksagung	298
14. Ehrenwörtliche Erklärung	300

1. Einleitung

1.1 Allgemein

Das Kniegelenk stellt das größte Gelenk des Menschen dar und ist seit 1836 Gegenstand intensiver Forschung in der Anatomie und Biomechanik sowie in den Disziplinen der Unfallchirurgie und Orthopädie. Sowohl in Hochleistungs- beziehungsweise Profisportarten als auch im Amateur- und Hobbybereich sind Läsionen des Kniegelenkes und hier insbesondere des Kapsel-Band-Apparates häufige Erscheinungen. Dabei sind die Gründe für die hohe Anzahl besagter Verletzungen einerseits im komplexen Aufbau des Kniegelenkes im Sinne einer Kombination aus Rad- und Scharniergelenk und der dadurch resultierenden Verletzungsanfälligkeit und andererseits in der hohen Belastung bei gleichzeitig großem Bewegungsumfang zu suchen. Somit nimmt die Diagnostik, die Therapie und die Nachbehandlung von Kniegelenks-Verletzungen einen besonderen Stellenwert in der Unfallchirurgie und Orthopädie ein.

In diesem Kapitel wird zunächst in die Anatomie, Physiologie und Biomechanik des Kniegelenkes eingeführt, um im Anschluss detailliert auf die Verletzungen des vorderen Kreuzbandes, auf die Komplikationen nach erlittener Kreuzbandruptur und auf die operative Versorgung dieser Verletzung einzugehen. Nachfolgend wird die Familie der Bone Morphogenetic Proteins dargestellt, der laut aktueller Forschung eine immense Bedeutung bei der Knochen-Heilung beziehungsweise bei der Knochen-Sehnen-Integration zugeschrieben wird. Zuletzt werden noch die Vorarbeiten für diese Arbeit dargestellt und anschließend die Zielsetzungen und die Versuchsanordnungen der dieser Studie zugrundeliegenden Experimente im Detail erläutert.

1.2 Anatomie und Biologie des Kniegelenkes

Das menschliche Kniegelenk (*Articulatio genus*) stellt aus Sicht der Mechanik ein Drehgleitgelenk dar (*Trochoginglymus*) und weist zwei Freiheitsgrade auf, genauer gesagt kann neben der Extension und Flexion eine axiale Längsrotationen in Beugestellung durchgeführt werden. Um den Anforderungen hinsichtlich der Stabilität und der Beweglichkeit gerecht zu werden, entstand im Rahmen der Evolution ein kompliziertes, zusammengesetztes Gelenk (*Articulatio composita*) bestehend aus dem Femorotibialgelenk (*Articulatio femorotibialis*) sowie dem Femoropatellargelenk (*Articulatio femoropatellaris*). Das Femorotibialgelenk kann seinerseits aufgrund der Ausprägung als *Articulatio bicondylaris* in einen medialen sowie lateralen Gelenkanteil unterteilt werden. Bei dem menschlichen Kniegelenk handelt es sich um ein Kapsel-Band-Apparat-geführtes Gelenk bei weitgehend fehlender knöcherner Führung.

1.2.1 Knöcherne Strukturen

Es lassen sich knöchern das Femur, die Tibia und die Patella sowie ein gegebenenfalls vorhandenes, als *Fabella* bezeichnetes Sesambein im *Caput laterale* des *Musculus gastrocnemius* unterscheiden. Das Femur ist distal in zwei bikonvexe, leicht geneigt zueinanderstehende Gelenkrollen, die Kondylen (*Condylus medialis* und *Condylus lateralis*) getrennt, wobei die ventrale, sattelförmige Verbindungsoberfläche als *Patella-Gleitlager* dient und als *Facies patellaris* bezeichnet wird. Dorsalseitig werden die Gelenkrollen durch die knorpelfreie *Fossa intercondylaris* separiert, welche in Extension zusammen mit der *Eminentia intercondylaris* der Tibia eine Verzahnung bildet, wodurch eine (Längs-)Rotation nicht mehr möglich ist. Ventralseitig der *Fossa intercondylaris* befindet sich leicht lateralseitig eine flache Rinne, die auch mit dem Begriff „Notch“ benannt wird und in Streckung das vordere Kreuzband aufnimmt beziehungsweise einlagert. Weiterhin lassen sich noch die beiden prominenten Knochenregionen proximal der Kondylen abgrenzen, wobei diese Strukturen als *Epicondylus medialis* und *Epicondylus lateralis* bezeichnet werden. Analog zur Femur-Konfiguration unterteilt sich der proximale Tibia-Anteil in zwei als *Condylus medialis* und *Condylus lateralis* charakterisierte Gelenkflächen, dessen Reliefe sich jedoch zu den Kondylen des Femurs inkongruent darstellen. Die beiden Tibia-Kondylen sind durch die *Eminentia intercondylaris* separiert, welche wie bereits zuvor beschrieben zusammen mit der *Fossa intercondylaris* des Femurs als Gelenkstabilisator in der Extensionsposition dient und damit in Streckstellung eine Rotationsbewegung verhindert. Zusammen ergeben die Tibia-Kondylen und die *Eminentia intercondylaris* das um 9° nach dorsal geneigte Tibiaplateau (9° Slope). Weiterhin stellen sich am Tibiakopf noch die als

Tuberositas tibiae bezeichnete knöcherne Insertionsregion des Ligamentum patellae sowie ein als Tuberculum iliotibialis Gerdy definierter Höcker dar. Diese höckerartige knöcherne Struktur dient der Aufnahme des Tractus iliotibialis. In evolutionärer Hinsicht lässt sich noch das Articulatio tibiofibularis proximalis abgrenzen, welches ein gelenkiges Residuum zwischen Tibia und Fibula darstellt und aus phylogenetischer Betrachtung einst an der Bildung des Kniegelenkes beteiligt war. Die Patella dient als größtes menschliches Sesambein der Verlängerung des Musculus quadrizeps femoris-Hebelarms und damit der Wirksamkeit respektive dem Kraftmoment der Quadrizepssehne. Dabei weist die Kniescheibe generell eine dreieckige Konfiguration auf, wobei dorsalseitig ein senkrechter Knochenfirst die Gelenkfläche in eine mediale und eine laterale Gelenkfacette unterteilt. Je nach Patellaöffnungswinkel, Gleitlager-Beschaffenheit und Patellamorphologie lassen sich unterschiedliche Patellatypen über die Klassifikationen nach Wiberg (Wiberg, 1941) und Baumgartl (Baumgartl, 1964) unterscheiden. Zeigen sich persistierende, eigenständige Knochenkernen, die vor allem lateral proximal vorkommen, wird in Abhängigkeit der Anzahl der Knochenfragmente beziehungsweise der Knochenkerne von einer Patella bipartita oder einer Patella multipartita gesprochen.

1.2.2 Kapselapparat

Die knöchernen Strukturen des Kniegelenkes werden von der Gelenkkapsel umgeben, wobei diese zweischichtig aufgebaut ist und in ein Stratum fibrosum und ein Stratum synoviale unterteilt wird. Das Stratum fibrosum stellt sich medial und lateral verstärkt da, weshalb diese stärker ausgeprägten und damit stabilisierenden Anteile auch als mediales und laterales Kapselband bezeichnet werden. Weiterhin besteht über das Stratum fibrosum eine fest verwachsene Verbindung der Gelenkkapsel einerseits mit der Basis des Meniscus medialis und andererseits mit der Basis des Meniscus lateralis. Das Stratum synoviale der Gelenkkapsel kann in einen anterioren, medialen und lateralen Anteil unterschieden werden, wobei diese Schicht darüber hinaus über seine dorsalen Anteile das vordere und hintere Kreuzband umgreifend erfasst. Aufgrund dieser Tatsache positioniert sich der Kreuzbandkomplex extraartikulär und damit extrasynovial, womit er anatomisch gesehen intrakapsulär zwischen dem Stratum fibrosum und dem Stratum synoviale liegt. Ventralseitig in der Region des distalen Femurs zeigt sich das als Corpus adiposum infrapatellare Hoffa bezeichnete, stark ausgeprägte Fettpolster, welches aus anatomischer Betrachtung eine Lage zwischen Stratum fibrosum und Stratum synoviale einnimmt. Diese sich pyramidenförmig darstellende Struktur wird häufig auch als Hoffa'scher Fettkörper bezeichnet.

1.2.3 Menisken

Wie bereits zuvor erwähnt wurde, zeigt sich eine Inkongruenz der femoralen und tibialen Gelenkflächen des menschlichen Kniegelenkes. Um diese mangelnde Übereinstimmung zu kompensieren, sind dem Kniegelenk intraartikulär die so genannten Menisken zwischengeschaltet. Diese im Querschnitt keilförmigen und im Längsschnitt sichelförmigen beziehungsweise kreisförmigen Strukturen sind sowohl medial als auch lateral lokalisiert, weshalb sie begrifflich als Meniscus medialis und Meniscus lateralis bezeichnet werden. Dabei sind beide Meniski aus einem komplexen System aus Faserknorpels aufgebaut. Anatomisch lassen sich sowohl für den medialen Meniskus als auch den lateralen Meniskus ein vorderes Horn respektive Vorderhorn, ein Meniskuskörper oder Pars intermedia und ein hinteres Horn beziehungsweise Hinterhorn unterscheiden. Beim erwachsenen Menschen zeigen sich große Unterschiede in der Vaskularisierung beider Meniski. Hier stellen sich die äußeren Bereiche der Menisken – also die Basis der Meniski – gut mit Blutgefäßen versorgt dar, wohingegen die inneren Meniskus-Anteile – also die Scheide der Meniski – größtenteils bis vollständig avaskulär sind. Weiterhin kann bezüglich der Blutversorgung eine Unterscheidung in ligamentäre und chondrale Anteile des Meniskus erfolgen, hier sind die ligamentäre Anteile der Menisken gut bis sehr gut mit Blutgefäßen versorgt während sich die chondralen Abschnitte fast bis vollständig avaskulär darstellen. Die chirurgische Behandlungsvariante und der Heilungserfolg von Meniskus-Läsionen orientiert sich an der zuvor genannten Blutversorgung der Meniski. Das hierzu verwendete dreiteilige Modell unterteilt sich entsprechend der histologischen Untersuchungen von Brindle *et al.* (2001) von außen nach innen mit einer sukzessiv abnehmenden vaskulären Versorgung in die „red-red“ Zone, die „red-white“ Zone und die „white-white“ Zone. Um bei axialer Belastung eine Translokation der Menisken aus dem Gelenkspalt zu verhindern, ist einerseits sowohl das Vorderhorn als auch das Hinterhorn des Meniscus medialis über ein kräftiges Band in der Area intercondylaris befestigt und andererseits das Vorderhorn des Meniscus lateralis über das Ligamentum transversum mit dem entsprechenden vorderen Horn des medialen Meniskus verbunden. Trotz dieser Fixierung ist die Lage der Menisken bewegungsabhängig, so dass über die meniskopatellären Bänder in Extension eine ventrale Verlagerung und in Flexion über bestehende Verbindungen zum Musculus popliteus und zum Musculus semimembranosus eine dorsale Translokation stattfindet. Die Außenrotationsbewegung des Kniegelenkes führt zu einer Verschiebung des Innenmeniskus nach ventral und des Außenmeniskus nach dorsal, wohingegen die Innenrotation im Kniegelenk eine reziproke Translokation des Innenmeniskus nach dorsal und des Außenmeniskus nach ventral zur Folge hat.

1.2.4 Ventraler Bandapparat

Da es sich bei dem menschlichen Kniegelenk um ein weitgehend bandgeführtes Gelenk handelt, verstärken kräftige Bänder die Gelenkkapsel, wobei topographisch ein ventraler beziehungsweise dorsaler, ein medialer respektive lateraler und ein zentraler Bandkomplex unterschieden werden.

Der ventrale Bandkomplex stellt den Streckapparat des Kniegelenkes dar und umfasst hauptsächlich die Patella sowie die über dieser verlaufenden Sehne des Musculus quadriceps femoris. Die besagte Sehne inseriert infrapatellar als Ligamentum patellae in die Tuberositas tibiae. Sowohl medial als auch lateral ziehen von der Quadrizeps- und der Patella-Sehne Fasern zum Femur, zur Tibia und zu den Menisken, wobei die Gesamtheit dieser Faserzüge als mediales beziehungsweise laterales Retinaculum bezeichnet wird. Topographisch lassen sich für den Streckapparat drei Schichten abgrenzen. Während die oberflächliche Schicht neben der Tendo musculi quadricipitis femoris das Retinaculum patellae longitudinale mediale und Retinaculum patellae longitudinale laterale umfasst, besteht die mittlere Schicht aus dem Retinaculum patellae transversale mediale (Ligamentum patellofemorale mediale, Ligamentum patellotibiale mediale) und dem Retinaculum patellae transversale laterale (Ligamentum patellofemorale laterale, Ligamentum patellotibiale laterale). Die tiefe Schicht setzt sich aus Faserzügen von der Patella zu den Meniskus-Vorderhörnern zusammen, wobei diese Fasern in einen medialen und lateralen Anteil – das Ligamentum patellomeniscale mediale und das Ligamentum patellomeniscale laterale – unterschieden werden.

1.2.5 Dorsaler Bandapparat

Der dorsale Bandapparat dient der Stabilisierung des Kniegelenkes, wobei er neben der Vermeidung einer Kniegelenks-Überstreckung auch zur Seitenstabilisierung beiträgt. Hier sind anatomisch die mediale und laterale Polkappe, die als Kapselverstärkungen dorsalseitig die Femurkondylen bedecken, die Sehne des Musculus semimembranosus, das Ligamentum popliteum obliquum sowie das Ligamentum arcuatum und der Musculus popliteus zu unterscheiden. Die Tendo musculi semimembranosi und ihre fünf unterschiedlichen Insertionszüge bilden in ihrer Gesamtheit den Pes anserinus profundus und stellen den posteromedialen Anteil des Kniegelenkes dar. Darüber hinaus ergeben Sehnenanteile des Musculus semimembranosus das Ligamentum popliteum obliquum, welches diagonal von distal-medial nach proximal-lateral über die Hinterwand des Kniegelenkes zieht und eine gegebenenfalls vorhandene Fabella beinhaltet beziehungsweise umfasst. Der posterolaterale Anteil des Kniegelenkes wird hauptsächlich

durch den Musculus popliteus und das Ligamentum popliteum arcuatum gebildet, wobei dieses Band in einen lateralen Zügel (Ligamentum popliteofibulare) und einen medialen Zügel unterteilt wird. Der mediale Zügel formiert dabei die typische bogenförmige Arkade, welche namensgebend für das Ligamentum popliteum arcuatum ist.

1.2.6 Lateraler und medialer Bandapparat

Zur Sicherung des Kniegelenkes in der Frontalebene und zur Vermeidung einer lateralen beziehungsweise medialen Aufklappbarkeit dient der Seitenbandapparat, wobei das Ligamentum collaterale mediale und das Ligamentum collaterale laterale unterschieden werden. Beide Bänder sind bei maximaler Extension nach Schlussrotation des Kniegelenkes gespannt und in Flexionsstellung entspannt, wodurch sich einerseits die Rotationsunfähigkeit des Kniegelenkes in Streckposition und andererseits die Rotationsfähigkeit des Kniegelenkes in Beugeposition erklären. Das Ligamentum collaterale mediale beziehungsweise Ligamentum collaterale tibiale wird auch als Innenband bezeichnet. Es hat seinen Ursprung im Epicondylus medialis femoris und endet nach diagonalem Verlauf Richtung Tibia an der Facies medialis tibiae hinter der Insertion des Pes anserinus superficialis. Dabei lässt sich ein vorderer Abschnitt, das Ligamentum collaterale mediale anterius, von einem hinteren Anteil, dem Ligamentum collaterale mediale posterius, unterscheiden. Eine Bursa ligamenti collateralis tibialis ist den beiden Anteilen zwischengelagert und dient der Verschiebbarkeit dieser Abschnitte gegeneinander. Während der vordere Anteil des Innenbandes keine Verbindung zum Meniscus medialis aufweist, ziehen Faserzüge der Pars profunda des Ligamentum collaterale mediale posterius sowohl vom Femur – in Form des Ligamentum meniscofemorale – als auch von der Tibia – als Ligamentum meniscotibiale – zur Innenmeniskus-Basis und inserieren an besagter Basis. Dabei werden das Ligamentum meniscofemorale und das Ligamentum meniscotibiale anatomisch auch als Ligamentum coronarium zusammengefasst. Das Ligamentum collaterale laterale beziehungsweise Ligamentum collaterale fibulare wird auch als Außenband bezeichnet und ist im Vergleich zum Innenband weniger komplex aufgebaut. Das Außenband ist weder mit dem Meniscus lateralis noch mit der lateralen Gelenkkapsel verbunden. Topographisch zeigt sich jedoch die Nähe zur Ursprungssehne des Musculus popliteus, die unterhalb des Ligamentum collaterale laterale im Sulcus popliteus verläuft.

1.2.7 Kreuzbandapparat

Wie bereits zuvor genannt, liegen die beiden ungefähr 3,8 – 4,0 cm langen menschlichen Kreuzbänder (Girgis *et al.*, 1975; Fick, 1904) des menschlichen Kniegelenkes extrasynovial mit ihrem Hauptanteil in der Fossa intercondylaris femoris und nehmen aufgrund ihrer hohen Anzahl an integrierten freien Nervenendigungen sowie Mechanorezeptoren eine herausragende Stellung bezüglich der Propriozeption, der Steuerung und der Stabilisierung der Kniegelenksbewegung ein. Die beiden Kreuzbänder werden zum sogenannten Kniebinnenbandapparat zusammengefasst, welcher auch als zentraler Bandkomplex bezeichnet wird. Dabei rechnen einige Autoren dem zentralen Bandkomplex noch das Ligamentum meniscofemorale anterius und das Ligamentum meniscofemorale posterius – zwei dem hinteren Kreuzband angelagerte Bandstrukturen – hinzu. Aufgrund der extrasynovialen Lage handelt es sich beim Ligamentum cruciatum anterius und beim Ligamentum cruciatum posterius streng genommen um keine wirklichen Binnenbänder des Kniegelenkes, sondern am ehesten um sich X-förmig überkreuzende Verstärkungszüge der Hinterwand der Gelenkkapsel, welche jedoch stark in den Gelenkraum hineinreichen und häufig durch einen Schleimbeutel, die Bursa intercruciata, separiert vorliegen. Das vordere Kreuzband, nachfolgend abgekürzt auch als VKB bezeichnet, verläuft von seinem dorsomedialen Ursprung am Condylus lateralis femoris in einem leicht rotierten, diagonalen, von dorsolateral nach ventromedial gerichteten Verlauf zur Insertion in der Area intercondylaris anterius der Tibia und hält regelhaft eine Faserverbindung zum Vorderhorn des Meniscus lateralis aufrecht. Dabei zeigt es nach Untersuchungen von Engebretsen *et al.* (1996) eine Reißfestigkeit von 1725 N. Es lassen sich zwei funktionell-anatomische Bündel des vorderen Kreuzbandes unterscheiden: das anteriomediale Bündel beziehungsweise die Pars anteromedialis und das posterolaterale Bündel respektive die Pars posterolateralis. Diese Anteile sind histologisch gesehen nicht voneinander trennbar. Einige Autoren unterscheiden ein zusätzliches drittes Bündel, die Pars intermedia oder das intermediäre Bündel. Während das anteriomediale (und das intermediäre) Bündel des vorderen Kreuzbandes in Extension gespannt und in Flexion erschlafft vorliegt, zeigt sich das posterolaterale Bündel reziprok dazu in Beugung gespannt und in Streckung erschlafft. Topographisch zeigt sich ein 5-10 mm oberhalb der tibialen Insertion liegender Bereich mit wechselnder Schub- und Druckbelastung. Aufgrund der unterschiedlichen Belastungsformen liegen in diesem Bereich des VKBs Einlagerungen von Faserknorpel vor, die funktionell wie ein Hypomochlion fungieren.

Das dorsal gelegene Ligamentum cruciatum posterius, welches nachfolgend auch als HKB abgekürzt wird, zeigt einen vom kreisförmigen Ursprung an der Facies lateralis des Condylus medialis femoris diagonalen, dorsolateral ziehenden Verlauf bis zur Insertion in

der Area intercondylaris posterior der Tibia, wobei ein ausgeprägter Bandanteil über die Hinterkante der Tibia reicht um an dessen dorsalen Fläche zu inserieren. Während Faserverbindung des vorderen Kreuzbandes zum Innenmeniskus-Vorderhorns existieren, bestehen regelhaft Faserzüge des hinteren Kreuzbandes, die eine Verbindung zum Hinterhorn des Außenmeniskus vermitteln. Auch für das hintere Kreuzband lassen sich zwei histologisch nicht-separierbare Anteile unterscheiden: das anterolaterale Bündel beziehungsweise die Pars anterolateralis und das posteromediale Bündel respektive die Pars posteromedialis. Dabei liegt laut Race *et al.* (1994) die Reißfestigkeit des anterolateralen Bündels bei 1494 N und der Pars posteromedialis bei 242 N. Im Gegensatz zum VKB lässt sich von diesen beiden Bündeln kein dritter Anteil beim HKB unterscheiden. Reziprok zu den Funktionszuständen des Ligamentum cruciatum anterius und seiner funktionellen Bündel zeigt sich beim hinteren Kreuzband das anterolaterale Bündel in Streckung erschlafft und in Beugung gespannt, wohingegen sich gegensätzlich die Pars posterolateralis in Extension gespannt und in Flexion erschlafft darstellt. Wie zuvor erwähnt, sind dem hinteren Kreuzband noch zwei meniskofemorale Bandstrukturen (Ligamentum meniscofemorale anterius, Ligamentum meniscofemorale posterius) angelagert, welche beide vom Außenmeniskus-Hinterhorn zur lateralen Fläche des Condylus medialis verlaufen. Während das Ligamentum meniscofemorale anterius – auch als Humphrey'sche Band bezeichnet – ventralseitig des Ligamentum cruciatum posterius zieht, zeigt das Ligamentum meniscofemorale posterior – auch als Wrisberg'sche Band bezeichnet – topographisch gesehen einen Verlauf dorsalseitig des hinteren Kreuzbandes.

1.2.8 Muskelapparat

Im späteren Kapitel zur Biomechanik des Kniegelenkes wird ausführlich auf die herausragende Bedeutung der Muskulatur eingegangen, wobei diese über synergistische beziehungsweise antagonistische Interaktionen die Bewegungen am Kniegelenk ermöglichen. Die Fascia lata liegt lateral subkutan und wird ab Kniegelenkshöhe als Fascia cruris bezeichnet. Sie wird durch den ebenfalls seitlich verlaufenden Tractus iliotibialis verstärkt und dient der Sicherung des Kniegelenkes vor seitlicher Translokation. Topographisch als auch funktionell lassen sich eine ventrale und eine dorsale Gruppe der Oberschenkelmuskulatur unterscheiden.

Die ventrale Gruppe oder Extensorengruppe umfasst den Musculus sartorius, den Musculus articularis genus sowie den Musculus quadrizeps femoris, wobei dieser seinerseits in vier Anteile – in den Musculus rectus femoris, den Musculus vastus medialis, den Musculus vastus intermedius und den Musculus vastus lateralis – unterteilt ist.

Während der Musculus sartorius funktionell der Innenrotation dient und der Musculus articularis genus als Gelenkkapselspanner fungiert, nimmt der Musculus quadrizeps femoris mit allen vier Anteilen eine herausragende Stellung für die Extension im Kniegelenk ein.

Die Flexoren, auch als dorsale Gruppe bezeichnet, setzen sich aus dem Musculus biceps femoris mit seinen zwei Anteilen – dem Caput longum und dem Caput breve – sowie aus dem Musculus semitendinosus und dem Musculus semimembranosus zusammen. Bis auf das Caput breve musculi biceps femoris nehmen alle Flexoren ihren gemeinsamen Ursprung am Tuber ischiadicum. Während dem Musculus biceps femoris das Caput fibulae als Ansatz dient, inseriert der Musculus semitendinosus am Pes anserinus und der Musculus semimembranosus am Condylus medialis der Tibia. Aufgrund ihres Verlaufes wurde für besagte Gruppe auch der Begriff der ischiocruralen Muskulatur geprägt. In der angloamerikanischen Literatur wird auch der Begriff der Hamstrings synonym verwendet.

1.2.9 Blutversorgung und Innervation

Der Vollständigkeit halber sei noch die vaskuläre Versorgung und die nervale Innervation des menschlichen Kniegelenkes erwähnt. Dabei findet die arterielle Kniegelenks-Versorgung hauptsächlich über die Arteria poplitea und ihrer fünf Abgänge in der Fossa poplitea (Äste: Arteria superior medialis genus, Arteria superior lateralis genus, Arteria media genus, Arteria inferior medialis genus, Arteria inferior lateralis genus) statt, wobei auch retrograd die Arteria recurrens tibialis anterior und die Arteria recurrens tibialis posterior der Blutversorgung dienen. Diese Gefäße sind über Verbindungen anastomosiert und bilden ein weitläufiges Gefäßnetz, das sogenannte Rete articulare genus. Bei Ausfall der Arteria poplitea aufgrund eines akuten arteriellen Verschlusses oder aufgrund einer Gefäß-Verletzung ist dieses Gefäßnetz jedoch als Kollateralisierungskreislauf nicht ausreichend.

Die Hautinnervation des Kniegelenkes stellt sich variabel dar, wobei die Versorgung aus den Segmenten L3-L4 stammt. Darüber hinaus ergibt sich hinsichtlich der Hautversorgung proximal noch die Beteiligung des Nervus cutaneus femoris lateralis auf der lateralen Seite und der Rami cutanei femoris anteriores aus dem Nervus femoralis auf der medialen Seite. Zusätzlich zeigt sich auf der medialen Seite in Gelenkspalt-Höhe eine Innervation über den R. cutaneus nervi obturatorii sowie unterhalb des Gelenkspalts des Nervus saphenus. Die Gelenk-Innervation des eigentlichen Kniegelenkes erfolgt entsprechend dem Hilton'schen Gesetz über die gleichen Nerven, die auch die an der Kniegelenksbewegung beteiligten Muskeln innervieren. Von den entsprechenden Muskeln gehen so genannte Rami articulares ab, die zur Gelenkkapsel, zum Bandapparat und zu den Menisken ziehen. Zu

nennen sind hier insbesondere die Rami articulares aus dem Nervus femoralis (aus den Muskelästen des Musculus vastus medialis, des Musculus vastus intermedius und des Musculus vastus lateralis), die Rami articulares des Nervus tibialis, die Rami articulares aus dem Nervus peroneus communis und der Ramus articularis aus dem Ramus posterius des Nervus obturatorius.

1.3 Biomechanik des Kniegelenkes

Zur Erkennung, Diagnostik und Behandlung von Erkrankungen des und Pathologien am menschlichen Kniegelenkes sind Kenntnisse über die Biomechanik dieses Gelenkes fundamental, wobei die ausgewogene, harmonische Interaktion der beteiligten Strukturen in Form von Knochen, Knorpel, Menisken, Bänder und Muskeln eine essentielle Rolle für die Funktion und die Belastung des Gelenkes einnimmt.

1.3.1 Grundlagen der Biomechanik und Gelenkführung

Chirurgische Interventionen führen zu Veränderungen der am Gelenk herrschenden Kräfte, welche möglicherweise enormen Einfluss auf die Gelenkfunktion haben beziehungsweise weitreichende Änderungen der Belastungssituation am Gelenk nach sich ziehen. So können durch Änderungen der biomechanischen Gelenkbeanspruchung Überbelastungen der kartilaginären und ligamentären Strukturen resultieren. Dabei unterteilen sich die biomechanischen Eigenschaften und Besonderheiten des menschlichen Kniegelenkes in zwei Aspekte, genauer gesagt in die strukturellen Eigenheiten und in die Kinematik des Kniegelenkes. Einige Autoren sehen allein in der Kinematik den wesentlichen Punkt zur Vorhersage der Gelenkbelastung, wohingegen andere Autoren neben der Biomechanik des Kniegelenkes zusätzlich noch die muskulären Belastungen sowie die Gelenkkinetik berücksichtigen. Insbesondere bei schmerzhaften Totalendoprothesen empfiehlt die aktuelle Literatur, diagnostisch in eine kinematische, kinetische oder systemische Genese zu unterscheiden.

Die Muskulatur nimmt bezüglich der Beanspruchung der Knochen eine enorme Bedeutung ein. Pauwels (Pauwels, 1951) zeigte, dass sich durch die Muskelkraft-Wirkung eine verminderte Belastung der ossären Strukturen im Sinne eines Ausgleiches beziehungsweise einer Reduktion von Biegemomenten an den Knochen ergeben, wobei diese Effekte über die Umleitung von auf die Knochen wirkenden Gewichtskräften und Gewichtsmomenten mittels Muskel- und Bänder-Arbeit zustande kommen.

Beim Menschen nehmen die Gelenke der unteren Extremität und ihre geometrischen Lagenbeziehungen zueinander eine große Bedeutung ein, wobei die großen Gelenke bei physiologischen Achsverhältnissen die mechanische Längsachse beziehungsweise Traglinie ergeben. Diese sogenannte Mikulicz-Linie lässt sich dadurch konstruieren, dass eine Gerade durch das Hüftkopf-Drehzentrum, durch die Mitte der Eminentia intercondylaris tibiae und durch das Zentrum der Malleolengabel am oberen Sprunggelenk gelegt wird. Durch eine anatomische 6° Kurvation des Femurschaftes in der Frontalebene bei übereinstimmender anatomischer und mechanischer Längsachse der Tibia ergeben sich

unterschiedliche Oberschenkel- und Unterschenkel-Achsen, weshalb das Kniegelenke mit einem Winkel von 174° nach außen abgewinkelt ist. Bei Abweichungen der Achsverhältnisse ergeben sich das Genu varum respektive die O-Bein-Achsabweichung mit nach lateral von der Mikulicz-Linie abweichendem Kniegelenkszentrum und das Genu valgum beziehungsweise die X-Bein-Achsdeviation mit sich medial von der Belastungs-Linie darstellender Mitte des Kniegelenkes. Beide Achsfehlstellungen führen bei längerem Bestehen unweigerlich zu veränderten Druckverhältnissen und Belastungen im Kniegelenk und können pathologische Veränderungen verursachen oder aufrechterhalten.

Das menschliche Kniegelenk weist insgesamt sechs Freiheitsgrade auf, wobei es sich genau genommen um je drei Translations-Freiheitsgrade und drei Rotations-Freiheitsgrade handelt. Die genaue Unterscheidung ist in der nachfolgenden **Tabelle 1** dargestellt.

Freiheitsgrad-Typ	Bewegung	Zugehörige Achse
Translation	Anterior – Posterior	Sagittalachse
	Medial – Lateral	Transversalachse
	Kompression – Distraktion	Longitudinalachse
Rotation	Flexion – Extension	Transversalachse
	Außenrotation – Innenrotation	Longitudinalachse
	Abduktion – Adduktion (Varus – Valgus)	Sagittalachse

Tabelle 1: Translations-Freiheitsgrade und Rotations-Freiheitsgrade des menschlichen Kniegelenkes

Unter physiologischen Bedingungen finden die oben genannten Translations- und Rotationsbewegungen gekoppelt statt und resultieren in einer kombinierten Roll-Gleit-Bewegung. Dabei wandelt sich die initiale, dorsale Abrollbewegung der Femurkondylen bei zunehmender Flexion im Kniegelenk in eine Dreh-Gleit-Bewegung mit dem Tibiaplateau als Basis um.

Eine knöcherne Gelenkführung und Vermeidung respektive Limitierung von Extreimbewegungen ist aufgrund der ausgeprägten Inkongruenz der femoralen und tibialen Gelenkflächen zueinander nicht möglich, weshalb dem Kapsel-Band-Apparat die Aufgabe einer geordneten Bewegungsführung des Kniegelenkes zukommt. Der Kapsel-Band-Apparat des Kniegelenkes zeigt eine relative Unelastizität und verhindert durch diese nur sehr geringe Dehnbarkeit sowohl eine Dislokation beziehungsweise Luxation als auch eine übertriebene, abnormale Beweglichkeit. Der Ausgleich der inkongruenten Gelenkpartner wird durch die zwischengeschalteten Menisken gewährleistet, welche neben ihrer kraftabsorbierenden „Stoßabfänger“-Funktion auch der homogenen Verteilung der übertragenen Kraft von Femur auf Tibia dienen.

Aufgrund der Beschaffenheit des hyalinen Knorpels von Femur und Tibia werden ausgezeichnete Reibungsverhältnisse mit einem Reibungskoeffizienten von 0,005 – 0,025

generiert (Santavirta *et al.*, 1998). Auf diese Weise entstehen bei der Kraftübertragung vom Oberschenkel auf den Unterschenkel unwesentliche Scherkräfte beziehungsweise Querkräfte.

1.3.2 Gelenkkinetik und Gelenkkräfte

Zur Bestimmung der komplexen muskuloskelettalen Gelenkbelastungen sind zahlreiche Variablen zu berücksichtigen. Beispielsweise ergeben sich am Femur sechs Freiheitsgrade und in Berücksichtigung der das Gelenk überspannenden Weichteilstrukturen mehr als 26 einwirkende Kräfte beziehungsweise Bewegungsmomente. Die Lösung der sich am Kniegelenk ergebenden kinetischen Gleichungen kann aufgrund der algorithmischen Komplexität nur approximiert werden, so dass zum heutigen Stand nur heuristische Verfahren angewendet werden können, welche lediglich optimierte Lösungen beziehungsweise Näherungs-Resultate liefern. Da *in vivo*-Messungen nur selten vorhanden beziehungsweise nur eingeschränkt umsetzbar sind, werden für die Analyse der an Gelenkbewegungen beteiligten Weichteilstrukturen computerbasierte Kalkulationsmethoden notwendig, wobei diese *in vivo*-Bestimmungen jedoch gut als Validierung der mathematischen Ansätze und somit zur Plausibilitätsprüfung dienen können. In den computergestützten Berechnungen dienen die räumliche Positionen von Becken, Oberschenkel, Unterschenkel und Fuß während der Bewegung als kinematische Variablen, die zur Bestimmung der auf das Gelenk wirkenden Kräfte, welche auch als äußere Momente bezeichnet werden, herangezogen werden können. Da sich bei der Bewegung ein mechanisches Gleichgewicht einstellen muss, sind den äußeren Momenten zwingend gleich große, reziproke innere Kräfte gegenüberzustellen. Diese inneren Momente werden durch die Muskeln und Bändern sowie durch ihre Hebelarme unter Zuhilfenahme von anatomischen Modellen berechnet. Die insgesamt am Kniegelenk wirkenden muskulären Kräfte werden zur sogenannten Gelenkkontaktkraft addiert. Unter physiologischen Bedingungen und Achsverhältnissen ergeben sich für das menschliche Kniegelenk beim normalen Gehen Gelenkkontaktkräfte zwischen dem 1,7-fachen und dem 7,1-fachen Körpergewicht (Komistek *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2004). Darüber hinaus müssen neben den direkten Gelenkkontaktkräften auch die auf das menschliche Kniegelenk wirkenden Scherkräfte berücksichtigt werden. Hier konnten Untersuchungen von Kellis (2001) und von Nagura *et al.* (2002) zeigen, dass medial-lateral und anterior-posterior Scherkräfte vom 0,7-fachen bis 3,9-fachen Körpergewicht bei normalen Gehbewegungen auf das Kniegelenk wirken. In einer auf computertomographischen Daten basierenden Studie zeigten Heller *et al.* (2001) eine statistisch-gemittelte 3,3-fache Maximalkraft beim Laufen, wobei die

durchschnittliche Spitzenbelastung für das Laufen beim 2,8-fachen Körpergewicht lag. Darüber hinaus resultierte beim Treppensteigen in besagter Analyse eine deutlich erhöhte Beanspruchung des menschlichen Kniegelenkes. Hier ergaben sich gemittelte Gelenkkontaktkräfte vom 5,9-fachen Körpergewicht, wobei die Spitzenbelastungen stets in Flexionsstellung über 15° auftraten. Weiterhin zeigten Heller *et al.* (2001), dass die anterior-posteriore Scherkraft-Belastung beim Laufen im Mittel beim 0,6-fachen Körpergewicht lag, wobei sich diese Scherkraft-Beanspruchung beim Treppensteigen mit einem gemittelten Wert vom 1,3-fachen Körpergewicht mehr als verdoppelte. Diese erheblichen mechanischen Belastungen des menschlichen Kniegelenkes in alltäglichen Bewegungen und Aktivitäten können bei Achsfehlstellungen massiv und empfindlich verändert vorliegen. So zeigte Heller *et al.* (2003), dass die auf das Kniegelenk wirkenden Gelenkkontaktkräfte bei Varus- und Valgusdeformitäten deutlich erhöht sind, wobei Varusfehlstellungen in einer zunehmenden Beanspruchung des medialen Kompartimentes resultieren und Valgusfehlstellungen zur gesteigerten Belastung des lateralen Kompartimentes führen. Dabei zeigte sich kein lineares, sondern am ehesten ein exponentielles Verhältnis zwischen Achsdeformität und Beanspruchung. Insbesondere führen Achsabweichungen über 4° im Vergleich zur anatomischen Konfiguration zu deutlich erhöhten Gelenk- und Scherkräften.

Im Gegensatz zu den zahlreichen mathematischen Ansätzen und Berechnungsmodellen sind *in vivo*-Belastungsmessungen nur selten vorhanden. Heinlein *et al.* (2007) führten eine Studie durch, in der eine instrumentierte Knieendoprothese (modifizierte Innex-Prothese, Typ FixUC) implantiert wurde, welche über eine Telemetrie zur Bestimmung der axialen Kraft – welcher der Gelenkkontaktkraft entspricht – und der Querkräfte – also der Scherkräfte – verfügte. Hier zeigten sich zehn Wochen nach Implantation maximale axiale Kräfte vom 2,6-fachen Körpergewicht beim Laufen und vom 2,9-fachen Körpergewicht beim Treppensteigen. Hinsichtlich der maximalen anterioren Scherkräfte ergaben sich Werte von 31% des Körpergewichtes beim Laufen und von 47% des Körpergewichtes beim Treppensteigen, wohingegen sich für die maximalen posterioren Querkräften für das Laufen Werte von 16% und für das Treppensteigen von 20% nachweisen ließen. Während die maximalen Querkräfte in medialer Richtung 31% des Körpergewichtes beim Laufen und 19% des Körpergewichtes beim Treppensteigen betrugen, zeigten sich für die lateralen Scherkräfte mit 2% des Körpergewichtes beim Laufen und 8% des Körpergewichtes beim Treppensteigen deutlich verminderte Belastungswerte.

Neben dem tibiofemorale Gelenk nimmt auch das patellofemorale Gelenk eine wichtige Rolle im Kontext der Gelenkbelastung des *Articulatio genus* ein und unterliegt in alltäglichen Aktivitäten ebenfalls erheblichen mechanischen Beanspruchungen. Heller *et al.*

(2001) wiesen in einem muskuloskelettalen Modell eine maximale Belastung des Patellofemoralgelenkes beim Treppensteigen und für eine Flexion von 55° nach. Für diese Situation resultierte eine gemittelte Belastung vom 3,0-fachen Körpergewicht. Beim Laufen traten in der initialen Standphase Belastungsmaxima vom 0,7-fachen Körpergewicht im Mittelwert auf.

1.3.3 Gelenkkinematik und Gelenkbewegung

Die Gelenkbewegung, die zugrundeliegenden kinematischen Abläufe und die am Gelenk wirkenden Belastungen beziehungsweise Gelenkkräfte sind eng miteinander verbunden. Zur Berechnung der Bewegungen am Kniegelenk werden in einigen Arbeiten Hautmarker verwendet, wobei andere Autoren die unzureichende Präzision dieser Methode bemängeln. Eine Weiterentwicklung der Hautmarker-basierten Methode zur Darstellung der komplexen, dreidimensionalen Bewegungen führte zum sogenannten Symmetrical Axis of Rotation Approach, kurz SARA, wobei sich in diesem Modell im Vergleich zu anderen Ansätzen die größte Genauigkeit zeigte (Ehrig *et al.*, 2007; Wirtz, 2011). Heller *et al.* (2007) bauten das vorhandene Hautmarker-basierte Modell unter Berücksichtigung der Kreuzbanddynamik und des Rotationseinflusses zu einem modifizierten 3D-Viergelenkkettenmodell aus, wobei die aus dieser Methodik erhaltenen Daten kernspintomographisch validiert wurden und sich insbesondere bei hohen Flexionsgraden realitätsnah zeigten. In besagter Studie ergab sich unter anderem, dass das Ligamentum cruciatum posterius eine mit der Beugung zunehmende stabilisierende Funktion einnimmt, wobei sich zwischen nicht beanspruchtem und belastetem Kniegelenk generell Unterschiede bezüglich der Elongation und Verkürzung der Kreuzbänder ergaben.

Wie zuvor bereits erwähnt, nehmen die Femurkondylen aufgrund ihrer divergenten Form und abhängig vom Beugungsgrad des Kniegelenkes unterschiedliche Positionen relativ zum Tibiaplateau ein. Während sich der vordere Abschnitt des lateralen Femurkondylus in maximaler Extension auf den ventralen Anteil des tibialen Plateaus projiziert, gleitet der mediale Femurkondylus mit zunehmender Flexion im Sinne einer Außenrotation nach dorsal, so dass bei maximaler Beugung die posteriore Gelenkfläche des Femurs mit dem posterioren Bereich des Tibiaplateaus kommuniziert. Darüber hinaus resultiert bei steigendem Flexionsgrad eine kombinierte Roll-Gleit-Bewegung des lateralen Femurkondylus entlang des Tibiaplateaus nach dorsal, weshalb sich auch hier der tibiofemorale Kontakt nach posterior verschiebt. Da bei Flexion der laterale Femurkondylus einen längeren Weg als der mediale Femurkondylus aufweist, resultiert automatisch eine

passive Innenrotation der Tibia relativ zum Femur, wobei der Drehpunkt im medialen tibiofemoralen Kontaktpunkt liegt. Auch femoral kommt es zu einer passiven Innenrotation bei progredienter Flexion, wobei dieses Phänomen als Screw-Home-Mechanismus bezeichnet wird. Aufgrund der anatomischen Größen-Divergenz des medialen und lateralen Kompartimentes ergibt sich bei zunehmender Beugung eine Varus-Rotation, die zu einem geringfügigen medialen Aufklappen der Tibia nach lateral führt und auch als Lift-off-Phänomen bezeichnet wird.

Das vordere Kreuzband nimmt eine besonders wichtige Rolle für den zuvor genannten Roll-Gleit-Mechanismus des menschlichen Kniegelenkes ein. Einerseits begrenzt das VKB die als ATT abgekürzte anteriore tibiale Translation sowohl in anterior-posteriorer Richtung als auch in der Rotationsachse, andererseits inhibiert es die Hyperextension im Kniegelenk. Während die passive tibiale Rotation bei zunehmender Flexion hauptsächlich durch die Kollateralbänder bewirkt wird, führt ein steigender Beugungswinkel zu einer Abnahme des in Extension steilen VKB-Winkels bis hin zu einer nahezu horizontalen Position bei $> 100^\circ$ flektiertem Kniegelenk. Während Untersuchungen von Engebretsen *et al.* (1996) eine Reißfestigkeit von 1725 N für das vordere Kreuzband ergaben, wiesen Woo *et al.* (1991) in einer detaillierteren Studie mit vergleichsweise jüngeren Menschen eine maximale Belastbarkeit von 2160 ± 157 N des VKBs bei einer Steifigkeit von 242 ± 28 N nach. Renström *et al.* (1986) zeigten zusätzlich die Abhängigkeit der Zugspannung des vorderen Kreuzbandes von der Oberschenkelmuskulatur. Dabei fand sich bei isolierter Funktion der ischiocruralen Muskulatur eine signifikante Reduktion der VKB-Zugspannung, wobei die isolierte Aktivität des Musculus quadriceps femoris zu einer signifikant erhöhten Zugspannung des Ligamentum cruciatum anterius führte.

Bei insuffizientem oder rupturiertem vorderen Kreuzband resultiert eine Desintegration des Roll-Gleit-Mechanismus (Jagodzynski *et al.*, 2015), die zu einer prolongierten Rollphase und zu einer anteriore Subluxation des lateralen tibialen Plateaus führt. Dabei war die anteriore Translation in $15-45^\circ$ Beugung auf den 2,5-fachen Wert erhöht; eine Auswirkung auf die posteriore Translation war nicht nachweisbar (Fukubayashi *et al.*, 1982). Während die Wirkung einer VKB-Insuffizienz beziehungsweise einer VKB-Ruptur auf die tibiale Innenrotation in der Literatur divergent beschrieben wird, führen kombinierte VKB- und Kollateralband-Läsionen zu einer varischen beziehungsweise valgischen Instabilität (Nielsen *et al.*, 1984). Die sich aus einer VKB-Insuffizienz ergebene Pathologie des Kniegelenkes wird auch als anterolaterale Rotationsinstabilität, abgekürzt als ALRI, bezeichnet. Sie führt langfristig sowohl zur tibiofemoralen und patellofemoralen Degeneration als auch zu meniskalen pathologischen Veränderungen, wobei die mediale Abnutzung dem lateralen Verschleiß überwiegt. Die VKB-Ruptur beziehungsweise VKB-

Insuffizienz resultiert generell in der grundlegenden Beeinträchtigung der physiologischen Bewegungsabläufe im Kniegelenk, die letztendlich zu sekundären chondralen Degenerationen und damit zur Ausbildung einer sekundären Gonarthrose führen können.

1.4 Verletzungen des vorderen Kreuzbandes

Das vordere Kreuzband nimmt eine Schlüsselrolle in der Stabilisierung des menschlichen Kniegelenkes ein. Rupturen oder Insuffizienzen können wie im vorherigen Kapitel angesprochen zu pathologischen Bewegungsmustern und zur chondralen und meniskalen Degeneration führen. Dadurch können Langzeitveränderungen wie Knorpel- und Meniskus-Schädigungen resultieren, auch die Ausbildung einer (posttraumatischen) Gonarthrose ist möglich, wobei dessen Prävalenz bei isolierten VKB-Rupturen nach Oiestad *et al.* (2009) bei 13% beträgt.

1.4.1 Epidemiologie und Inzidenz

Partielle und vollständige Rupturen des Ligamentum cruciatum anterius machen je nach Autor 20% (Majewski *et al.*, 2006), 25% (Krudwig, 2000) beziehungsweise 30% (Gokeler *et al.*, 2010) aller Verletzungen des Kniegelenkes aus und treten typischerweise im Rahmen von Sport-Verletzungen auf. Die mittlere Ausfallsdauer der Athleten nach VKB-Rupturen beträgt ungefähr 6-9 Monate, wobei nur 60-70% die Rückkehr zum früheren Sportlevel erreichen (Biau *et al.*, 2007) und für einige Patienten die Verletzung gleichbedeutend mit dem Ende der Wettkampfkariere ist. Selbst bei operativ versorgten Patienten bestehen im Anschluss weitere Risiken. So wiesen beispielsweise Untersuchungen von Shelbourne *et al.* (2009) bei weiblichen Athleten in der Altersgruppe unter 18 Jahre für das operierte Kniegelenk Re-Ruptur-Raten von bis zu 17% nach. Weiterhin zeigten sich in der Studie auch für die gesunde ipsilaterale Seite Ruptur-Raten von bis zu 17%.

Die Inzidenzen zeigen sich in den letzten Jahrzehnten durch vermehrte sportliche Betätigung der Bevölkerung progredient. Nach Benecke (2015) ergeben sich für Deutschland kalkuliert ungefähr 35.000 VKB-Rupturen jährlich, was einer Inzidenz von durchschnittlich 45 auf 100.000 Einwohnern entspricht (Krudwig, 2000). Für die amerikanische Bevölkerung ereignen sich nach Griffin *et al.* (2000) im Jahr ungefähr 80.000 Rupturen des vorderen Kreuzbandes, was in einer Inzidenz von 1 auf 3.000 – 3.500 Einwohner beziehungsweise umgerechnet 29-33 auf 100.000 US-Einwohnern (Fu *et al.*, 1999; Huston *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2009) resultiert. Nach Gokeler *et al.* (2010) liegt die VKB-Ruptur-Rate in Norwegen beruhend auf gut erhobenen, registrierten OP-Daten bei einer Inzidenz von 34 auf 100.000 Bürgern. Dabei zeigt sich eine altersabhängige Verteilung der Rupturen des vorderen Kreuzbandes, weshalb das Alter als Risikofaktor beurteilt wird. Laut Benecke (2015) treten zwei Drittel aller VKB-Risse in der Risiko-Altersgruppe von 15-45 Jahre mit einer Inzidenz von 1 auf 1.750 Einwohnern beziehungsweise 57 auf 100.000 Bürgern auf (Petersen *et al.*, 2009), wobei sich zudem eine Hochrisiko-Subgruppe für die

15-25-jährigen Männern und Frauen mit einer Inzidenz von 1 auf 1.000 Einwohnern respektive 100 von 100.000 Einwohnern abgrenzen lässt (Petersen *et al.*, 2009; Griffin *et al.*, 2000). Auch Gokeler *et al.* (2010) wiesen aufgrund der zuvor erwähnten norwegischen Register-Daten Altersgruppen mit erhöhtem Risiko für Rupturen des vorderen Kreuzbandes nach. Es ergab sich eine Inzidenz von 85 VKB-Rupturen auf 100.000 Einwohnern für die Risiko-Altersgruppe von 16-39 Jahren. Bei Renstrom *et al.* (2008) zeigten sich die höchsten Ruptur-Raten bei Frauen im Alter von 15-19 Jahren.

Weiterhin wurden in unterschiedlichen Studien geschlechterabhängige VKB-Ruptur-Raten beobachtet, so dass sich das weibliche Geschlecht als zusätzlicher Risikofaktor identifizieren ließ. Es zeigten sich 4-fach bis 6-fach erhöhte Risiken für VKB-Rupturen bei weiblichen Sportlerinnen (Arendt *et al.*, 1995; Hewett *et al.*, 2005; Messina *et al.*, 1999; Myklebust *et al.*, 1998; Olsen *et al.*, 2004), wobei der Grund für die Geschlechterabhängigkeit noch nicht vollständig geklärt ist.

Petersen *et al.* (2009) und Olsen *et al.* (2004) zeigten in ihren Analysen, dass auch die Sportart als Risiko für VKB-Verletzungen gilt. Nach Benecke (2015) resultierten erhöhte Risiken für die Sportarten Fußball, Basketball, Handball sowie Alpinskifahren. Nach Gokeler *et al.* (2010) handelt es sich beim American Football, Fußball, Skifahren und Handball um Sportarten mit erhöhter VKB-Ruptur-Gefährdung.

Weiterhin vermuten die zuvor genannten Autoren auch einen Unterschied der VKB-Riss-Inzidenz zwischen Wettkampf und Training, wobei diese Annahme mit der erhöhten Wettkampf-Intensität im Vergleich zum Training begründet wird.

Allgemein stellen VKB-Rupturen sehr häufige Verletzungen dar, welche beispielsweise in der USA mit jährlichen Behandlungskosten von rund 2 Milliarden US-Dollar (Spindler *et al.*, 2008) verbunden und somit von gesellschaftlicher Bedeutung sind. Somit weisen VKB-Verletzungen eine sozioökonomische Relevanz auf.

1.4.2 Verletzungsmechanismus und Risikofaktoren

Die häufigsten Ursachen für VKB-Verletzungen finden sich bei Traumata bei Sportarten, in denen Drehbewegungen im Kniegelenk mit Sprüngen verbunden sind. Dabei handelt es sich in 70-80% um Valgus- oder Rotationstraumata, die auf indirekte Krafteinwirkungen zurückzuführen sind und als Nicht-Kontakt-Verletzungen beziehungsweise Non-Contact-VBK-Verletzungen klassifiziert werden. Obwohl sich in bestimmten Verletzungssituationen spezifische Bewegungsmuster identifizieren lassen, müssen diese jedoch stets in Kombination mit anderen Bewegungsabläufen gesehen werden, welche sich teils protektiv, teils begünstigend auf Verletzungen des vorderen Kreuzbandes auswirken. Häufig führen

erst zahlreiche Wiederholungen problembehafteter Bewegungen und pathologischer Bewegungsmuster zur chronischen Überbeanspruchung des VKBs und dadurch zur Ruptur des vorderen Kreuzbandes.

Yu *et al.* (2007) postulierten, dass eine bei Bewegungsbeginn bestehende Kniebeugung von 20-30° eine große Belastung für das vordere Kreuzband darstellt und damit Verletzung begünstigt. Dabei sind die besagten Kniegelenks-Flexionswinkel von 20-30° mit einem deutlich ausgeprägten tibialen Vorschub vergesellschaftet, wodurch das vordere Kreuzband eine starke Beanspruchung erfährt. Darüber hinaus kann die ischiokrurale Muskulatur für diese Winkelstellung keine ausreichenden Zügelkräfte ausüben und ist damit nicht in der Lage, eine partielle Belastung vom vorderen Kreuzband zu übernehmen. Weiterhin haben komplexe Kombinationen aus mehreren Kräften, deren ungünstige Abfolge und Bewegungen mit Innenrotations- oder Außenrotations-Momenten begünstigende Effekte auf eine mögliche Rupturierung des VKBs. Hewett *et al.* (2005) zeigten, dass sich einerseits eine initial vorliegende, deutlich ausgeprägte Valgus- oder Varus-Stellung und andererseits ein im Bewegungsverlauf dynamisch zunehmender Knievalgus negativ prädiktiv auf die Verletzung des vorderen Kreuzbandes auswirken kann. Darüber hinaus konnte in weiteren Studien nachgewiesen werden, dass eine tibiale Außenrotation (Boden *et al.*, 2000), eine Fixierung des Fußgelenkes nach Landung in Kombination mit einer Innenrotations-Komponente (Olsen *et al.*, 2004) oder eine harte Landung mit Aufsetzen des flachen Fußes beziehungsweise der Ferse mit den resultierenden hohen Impaktierungskräften und Belastungen der beteiligten Körperstrukturen (Krosshaug *et al.*, 2007) begünstigende Faktoren für die Ruptur des vorderen Kreuzbandes darstellen.

Die beim Fussball typischerweise zu Kreuzbandverletzungen führende Situation besteht zumeist in der Kombination eines durch die Schuh-Stollen fixierten Fußes mit einer Körperdrehung in die entgegengesetzte Richtung. Weiterhin resultieren bei Landungen oder langen Schritten bei gestrecktem Kniegelenk VKB-Läsionen, die meist mit unerwarteten Bewegungsmustern und somit ungenügender Reaktionszeit zur adäquaten Vorspannung der kniegelenksnahen Muskulatur einhergehen (Gokeler *et al.*, 2010). Im Handballsport zeigen Analysen, dass beim Großteil der VKB-Rupturen plötzliche Drehbeziehungsweise Richtungsänderungen im Sinne von Plant-and-Cut-Manövern in Kombination mit einer Valgus-Stellung und einer Innen- oder Außenrotation des Kniegelenkes bei fast vollständiger Extension vorliegen (Olsen *et al.*, 2004). Andere Pathomechanismen lagen bei Landungen mit exzessiver Valgus-Stellung, bei Außenrotation und nahezu voller Streckung des Kniegelenkes mit zumeist gleichzeitiger Beeinträchtigung des Gleichgewichtes zugrunde. Im Skisport stellt die Bewegungskonstellation aus stark

flektiertem Kniegelenk, dorsal zum Kniegelenk befindlichem Körperschwerpunkt, Innenrotation des Unterschenkels und gleichzeitiger Hüftgelenksflexion mit hoher Spannung des Musculus quadrizeps femoris und des vorderen Kreuzbandes sowie einem ungünstigen Hebelarm der ischiokruralen Muskulatur einen negativen Faktor für mögliche Rupturen des vorderen Kreuzbandes (Ettlinger *et al.*, 1995; Colby *et al.*, 2000) dar, wobei McLean *et al.* (2005) für dieses Bewegungsmuster den Begriff der Phantomfußmechanik prägten.

Die Fachliteratur schlägt zahlreiche unterschiedliche Klassifikation der Risikofaktoren vor. Dabei werden einerseits in die modifizierbaren und nicht-modifizierbaren Risikofaktoren, andererseits in die extrinsischen und intrinsischen Risikoelementen unterschieden. Nach Bahr *et al.* (2005) umfassen die intrinsischen Risikofaktoren neben dem Alter, dem Geschlecht, dem Gesundheits- und Fitnesszustand auch die individuelle Prädisposition (Anatomie, Leistungsniveau, psychologische Faktoren) eines Sportlers oder einer Sportlerin. Zu den extrinsischen Risikofaktoren gehören die sportartspezifischen Faktoren, die Schutzausrüstung, die Sportgeräte sowie die Umwelt beziehungsweise die Sportstätte. Zusammen ergeben die intrinsischen und extrinsischen Risikofaktoren die Verletzungsanfälligkeit des Athleten respektive der Athletin und werden auch als ereignisferne Faktoren bezeichnet. Unter Hinzunahme der ereignisnahen Risikofaktoren, die dem Verletzungs- beziehungsweise dem Pathomechanismus entsprechen, ergibt sich unter zusätzlicher Berücksichtigung der Spielsituation, des Spieler-Gegenspieler-Verhaltens, der Körper-, Gelenk- und Gewebe-Biomechanik sowie des biomechanischen Bewegungsablaufes die mögliche VKB-Verletzung. Die nachfolgende **Abbildung 1** stellt das Modell für die Ursachen von VKB-Verletzungen modifiziert nach Gokeler *et al.* (2010) und Bahr *et al.* (2005) graphisch dar.

Darüber hinaus unterteilt Gokeler *et al.* (2010) die intrinsischen Faktoren in anatomische und neuromuskuläre sowie hormonelle und biomechanische Risikofaktoren. Anatomisch vermuteten Hewett *et al.* (2001) einen Zusammenhang zwischen erhöhter Inzidenz von VKB-Rupturen bei einem erhöhten Q-Winkel, wobei andere Autoren im Q-Winkel nur eine eingeschränkte prädiktive Qualität sahen (Beynnon *et al.*, 2008). Desweiteren wurde postuliert, dass eine kleinere interkondyläre Notch beziehungsweise Fossa intercondylaris einerseits kaliberschwächere Kreuzbänder und andererseits ein VKB-Impingement bedingen kann, wobei diese beiden Auswirkungen zu erhöhten Raten von VKB-Rissen führen können (Olsen *et al.*, 2004).



Abbildung 1: Modell der Ursachen von VKB-Verletzungen im Sport (modifiziert nach Gokeler et al. (2010) und Bahr et al. (2005))

In der Fachliteratur werden zusätzlich zu den zuvor erwähnten Risikofaktoren auch mögliche hormonelle Einflüsse auf die Inzidenz von VKB-Verletzungen kontrovers diskutiert. So werden weibliche Sexualhormone aufgrund ihres Einflusses auf das Bindegewebe und auf Bänder und Sehnen auch als hormonelle Risikofaktoren bei Sportlerinnen angesehen (Beynnon *et al.*, 2008). Als Pathomechanismus werden die Östrogen-vermittelte erhöhte Bandlaxität der Kreuzbänder ebenso wie eine erniedrigte, propriozeptive neuromuskuläre Aktivierung der stabilisierenden Muskulatur diskutiert. Dabei wird die Vermutung, dass solche hormonellen Risikofaktoren existieren, durch Studienergebnisse mit reduzierter Inzidenz von Kniegelenks-Distorsionen bei Einnahme oraler Kontrazeptiva gestützt (Beynnon *et al.*, 2008). Die neuromuskulären Risikofaktoren basieren allgemein auf der unterbewussten Stimulation stabilisierender Bänder, Sehnen und Muskeln als Antwort auf sensorische Stimuli. Während eine hohe Gelenksteife eher protektiv gesehen wird, scheint sich aufgrund von muskulärer Ermüdung beziehungsweise abnormaler Beanspruchung ein Ungleichgewicht zwischen Gelenklaxität und -festigkeit einzustellen (Gokeler *et al.*, 2010). So konnten Zebis *et al.* (2010) nachweisen, dass bei

zunehmender Ermüdung oder übermäßige Belastung sukzessive weniger schnelle Muskelfasern rekrutiert werden, weswegen sich die muskulären Reaktionszeiten verlängern und infolgedessen erhöhte Kreuzband-Aktivitätszeiten und -Beanspruchungen resultieren. Bei Frauen kann auch ein ungünstiges Quadrizeps-Hamstrings-Ungleichgewicht vorliegen, wodurch die ischiokrurale Muskulatur eine zu geringe agonistische Wirkung auf das VKB zu haben scheint (Hewett *et al.*, 2005).

In der aktuellen Fachliteratur finden sich als biomechanische Risikofaktoren unter anderem auch ein als Valgus Collapse bezeichneter Pathomechanismus, der die Krafteinwirkung bei kombinierter Bewegung in frontaler, sagittaler und transversaler Ebene beschreibt (Quatman *et al.*, 2009). Hier kommt es nach Landungen, langen Schritten oder Ausfallschritten durch unterschiedliche Bewegungen zu einer erhöhten Valguskraft bei gleichzeitigem Tibiavorschub, was zu einer erhöhten VKB-Belastung und damit zu höheren VKB-Ruptur-Raten führt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass bei Sportlerinnen eine vermehrte ligamentäre Dominanz vorliegt (Hewett *et al.*, 2010). Infolgedessen wird das Kniegelenk weniger muskulär kontrolliert und mehr ligamentär geführt, wodurch die Bandstrukturen erhöhten Belastungen ausgesetzt werden und höhere Valgus-Drehmomente auftreten können.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass VKB-Verletzungen und ihre Pathomechanismen sowie Risikofaktoren individuell und multifaktoriell betrachtet werden müssen und weiterführende Studien mit einem integrativen Ansatz für das Verständnis der Natur der Kreuzbandverletzungen und für die Prävention von beziehungsweise Therapie-Optimierung bei VKB-Rupturen erforderlich sind.

1.4.3 Diagnostik der VKB-Ruptur

Zahlreiche unfallchirurgische und orthopädische Fachbücher beschäftigen sich mit der Diagnostik der VKB-Läsionen und widmen sich der Erstellung klinischer Tests beziehungsweise der Optimierung der Spezifität und Sensitivität der vorhandenen Testmethoden. Dabei gestaltet sich die klinische Diagnose einer akuten VKB-Verletzung oder einer chronischen Instabilität des vorderen Kreuzbandes oft nicht einfach. Initial sollte eine detaillierte Anamnese erfolgen, die unter anderem die Abklärung eines subjektiven Instabilitätsgefühls enthält und wichtige Hinweise zum Unfallmechanismus liefert. Hier können bereits Anhalte für mögliche Begleitverletzungen des hinteren Kreuzbandes, der Menisken, der Kollateralbänder oder des Knorpels gewonnen werden. Bei isolierten VKB-Rupturen ohne nennenswerte Hämarthros-Bildung kann die klinische

Beschwerdesymptomatik lediglich geringgradig ausfallen, wohingegen komplexe Verletzungen mit assoziierten Begleitpathologien zumeist mit ausgeprägten Schmerzzuständen einhergehen.

Die körperliche Untersuchung kann klassischerweise in die Inspektion, die Palpation und die Anwendung klinischer Tests eingeteilt werden und soll dem Nachweis einer Instabilität oder der Verdachtsdiagnose einer VKB-Läsion dienen. Zumeist besteht bei frischer Verletzung eine sichtbare intraartikuläre Ergussbildung, die in den Recessus suprapatellaris hineinreicht. Dabei führt nach Steinbrück *et al.* (1988) ein Trauma mit VKB-Ruptur in 50-80% der Fälle zu einer Hämarthros-Bildung, welche mittels Punktion nachweisbar ist und auf einen Einriss des synovialen VBK-Schlauches und der damit einhergehenden Einblutung in das Kniegelenk hindeutet. Weiterhin kann eine eingeschränkte Beweglichkeit wie beispielsweise ein endgradiges Defizit der Extension auftreten oder es resultieren Prellmarken durch das Trauma, die auch wichtige Aufschlüsse auf begleitende, assoziierte Verletzungen geben können. Muskuläre Defizite und sichtbare Achsabweichungen bedürfen einer weiteren bildgebenden Abklärung mittels einer konventionellen Röntgen-Diagnostik, einer Computertomographie, einer Gelenksonographie oder einer Kernspintomographie.

In der Palpation können strukturspezifische Druckschmerzpunkte des medialen und lateralen Kollateralbandes ebenso wie Druckschmerzhaftigkeiten im medialen oder lateralen Gelenkspalt im Sinne möglicher Meniskopathologien erfasst werden. Weiterhin gehört zu diesem Abschnitt der klinischen Untersuchung die Palpation des medialen patellofemoralen Ligamentes sowie von etwaigen Sehnen- und Muskellücken. Bei klinisch relevanter Hämarthros-Bildung kommt es zum Phänomen der tanzenden Patella im Sinne des Nachweises eines intraartikulären Gelenkergusses, wobei bei einer ausgeprägten Gelenktamponade zur Entlastung und zur Schmerzreduktion eine Gelenkpunktion (Arthrozentese) unter sterilen Kautelen erfolgen kann oder gar sollte.

Zur Beurteilung und Diagnostik einer VKB-Ruptur dienen klinische Tests der validen und sicheren Befunderhebung, weshalb diese Testungen die Hauptrolle in der klinischen Untersuchung einnehmen. Neben dem Varus- und Valgus-Stress-Test kommen üblicherweise die Schubladen-Tests, der Lachman-Test, der Pivot-Shift-Test und der Lever-Sign-Test im klinischen Alltag zum Einsatz, obgleich in der Literatur zahlreiche Stabilitätstest zur Integritätsprüfung der ligamentären Kniegelenks-Strukturen beschrieben sind. Aufgrund individueller Unterschiede der Gelenk- beziehungsweise Bandlaxizität sollte die Untersuchungsdurchführung immer im Seitenvergleich erfolgen.

Beim Varus- und Valgus-Stress-Test werden einerseits in Extension Verletzungen der posteromedialen und posterolateralen Gelenkecke geprüft und andererseits bei Flexion von 20°-30° eine Testung auf hochgradige Läsionen des medialen und des lateralen Kollateralbandes durchgeführt, wobei die Aufklappbarkeit in drei Grade (Grad I: 0-5°, Grad II: 5-10°, Grad III: >10°) unterteilt wird. Dabei zeigten Studien, dass die Beschwerde- und Schmerzsymptomatik bei vollständigen Rupturen der Kollateralbandstrukturen häufig weniger ausgeprägt sind als bei Partialrupturen, was mit den bei Teilrupturen noch partiell erhaltenen Schmerz-Rezeptoren und der damit noch vorhandenen Schmerz-Weiterleitung begründet wird.

Die klassischen Schubladen-Tests am Kniegelenk lassen sich in die Testung auf eine vordere Schublade und eine hintere Schublade unterteilen. Während klinisch eine positive vordere Schublade bei VKB-Rupturen imponiert, deutet eine positive hintere Schublade auf Verletzungen des hinteren Kreuzbandes hin. Nach Zantop *et al.* (2010) können sich im Rahmen der vorderen Schublade Fehlinterpretationen ergeben. Einerseits können aufgrund einer Anspannung der ischiokruralen Muskulatur falsch-negative Befunde resultieren, weshalb der vordere Schubladen-Test lediglich der Angabe eines weichen oder harten Anschlages dienen und nicht zur Einteilung in eine millimeter-basierte Graduierung verwendet werden sollte. Andererseits kann sich durch eine HBK-Insuffizienz spontan eine posteriore tibiale Subluxation und infolgedessen eine Fehlinterpretation im Sinne einer pseudopositiven vorderen Schublade ergeben. So resultiert in diesem Fall die Durchführung des vorderen Schubladen-Tests in einer Repositionierung der in posteriorer Subluxation-Stellung befindlichen Tibia in die Neutralstellung. Daher sollte ein positives vorderes Schubladenphänomen bis zum Gegenbeweis auch als Verdacht auf eine HKB-Verletzung interpretiert werden.

Der im Vergleich zum vorderen Schubladenphänomen sensitivere Lachman-Test überprüft die anteriore tibiale Translation in 20°-30° Flexion im Kniegelenk, wodurch die bei den Schubladen-Tests verfälschende Beeinflussung durch die Hamstrings minimiert wird. In der Bewertung wird nach den Empfehlungen des internationalen Knie-Dokumentations-Komitees (IKDC) eine Einteilung in vier Grade vorgenommen: Grad I (normal): 1-2 mm, Grad II (fast normal): 3-5 mm, Grad III (abnormal): 6-10 mm, Grad IV (stark abnormal): >10 mm. Darüber hinaus wird die Qualität des Endpunkts in einen weichen und harten Anschlag unterteilt. Zum Ausgleich der subjektiven Bewertung wurden instrumentierte Versionen des Lachman-Tests konzipiert, die eine maschinelle Quantifizierung der anterioren tibialen Translation ermöglichen. Dabei konnte beispielsweise unter Verwendung des KT 1000-Arthrometer (MEDmetric Corp., San Diego, USA) eine objektivierbare Seitendifferenz von 3 mm bei 99% der Patienten mit chronischer

VKB-Instabilität und bei 95% der untersuchten Personen mit akuter VKB-Ruptur nachgewiesen werden (Rangger *et al.*, 1993).

Der Pivot-Shift-Test stellt im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen statistischen Tests der anterioren Tibia-Translation keinen statischen, sondern einen dynamischen Subluxations-Test dar. Als bekanntester Vertreter dieser Gruppe nutzt der Test die Zugrichtung und Spannungsänderung des Tractus tibialis ab 20°-30° Kniegelenks-Flexion und der daraus resultierenden Repositionierung einer anterioren tibialen Subluxationsstellung bei VKB-Rupturen beziehungsweise -Insuffizienzen. Der Pivot-Shift-Test ist dabei im Gegensatz zum Lachman-Test oder Schubladen-Phänomen gut mit der subjektiven Patientenzufriedenheit korrelierbar (Kocher *et al.*, 2002) und wird daher zur Indikationsstellung herangezogen. Die Einteilung erfolgt in vier Grade und beurteilt den Repositionsvorgang (Grad I (normal, Test negativ): seitengleiches Repositionsphänomen; Grad II (fast normal, Test 1-fach positiv): Gleiten, leichtes Repositionsphänomen; Grad III (abnormal; Test 2-fach positiv): Subluxation, dumpfes Repositionsphänomen; Grad III (stark abnormal, Test 3-fach positiv): kurze Blockade, lautes Repositionsphänomen).

Ein relativ neuer klinischer Untersuchungstest ist der sogenannte Lever-Sign-Test (Lelli *et al.*, 2016), dessen Autor eine Sensivität von 100% postulierte. Nach neueren Analysen von Massey *et al.* (2017) zeigt sich jedoch für den Lever-Sign-Test kein signifikanter Sensitivitäts- und Spezifitäts-Unterschied im Vergleich zum Lachman-Test, zur vorderen Schublade oder zum Pivot-Shift. Die nachfolgend abgebildete **Tabelle 2** listet die Sensitivitäten und Spezifitäten der zuvor genannten klinischen VKB-Testungen entsprechend der Daten von Benjaminse *et al.* (2006) und Massey *et al.* (2017) auf.

Test	Sensitivität	Spezifität
Vordere Schublade-Test	55% *	92% *
Lachman-Test	85% *	94% *
Pivot-Shift-Test	24% *	98% *
Lever-Sign-Test	83% **	80% **

Tabelle 2: Sensitivität und Spezifität klinischer VKB-Tests nach * Benjaminse *et al.* (2006) und ** Massey *et al.* (2017)

Die nativ-radiologische Bildgebung des Kniegelenkes in drei Ebenen (anterior-posterior, lateral, Patella axial) sollte obligat nach Kniegelenkstrauma erfolgen. Dadurch können anterioren Eminentia-Frakturen im Sinne knöcherner VKB-Ausrisse von ligamentäre Verletzungen unterschieden werden, wobei diese ebenfalls pathognomische radiologische Zeichen hervorrufen können. Beispielsweise können das Sulcus-Zeichen – eine Impaktion des lateralen Femurkondylus in Linea terminalis-Höhe – oder die Segond-Fraktur – ein knöcherner Kapselausschuss an der Insertionsstelle am anterolateralen Tibiaplateau – als

indirekte Hinweise auf VKB-Rupturen interpretiert werden. Bei klinischem Hinweis auf mediale oder laterale Aufklappbarkeit des Kollateralbandapparates sollten gehaltene Varus- oder Valgus-Stressaufnahmen zur Standarddiagnostik gehören, genauso sollte bei anterior-posteriorer Instabilität eine gehaltene Aufnahme durchgeführt werden. Während die CT-Untersuchung gegebenenfalls mit dreidimensionaler Rekonstruktion bei primärem Verdacht auf eine VKB-Ruptur nur noch eine untergeordnete Rolle spielt, nimmt sie bei Rezidiv-Instabilitäten zur Beurteilung von Implantatlage, Tunnelpositionen und Tunnelweite nach VKB-Plastiken und bei der Planung von Revisions-Operationen einen wichtigen Stellenwert ein. Eine MRT-Bildgebung sollte bei klinischem Verdacht als auch bei gesicherter klinischer Diagnose durchgeführt werden, um gegebenenfalls assoziierte Begleitverletzungen darzustellen. Dabei sollte die Indikation zur operativen Versorgung über die funktionelle Analyse der VKB-Funktion im Rahmen der klinischen Untersuchung und nicht über die MRT-Schnittbildgebung erfolgen. Die MRT-Diagnostik zeigt in der Fachliteratur eine Sensitivität von 92-100% und eine Spezifität von 85-100% (Starman *et al.*, 2007; Sanders *et al.*, 2005). Zu den direkten Zeichen einer VKB-Ruptur in der kernspintomographischen Bildgebung zählen die Kontinuitätsunterbrechung, die Signalunregelmäßigkeit im Bandverlauf, die Veränderungen des VKB-Anstiegswinkels (horizontaler Verlauf mit $< 52^\circ$ Neigungswinkel) und das so genannte Empty notch-Zeichen. Daneben können noch das HKB-Buckling beziehungsweise das HKB-Buckelphänomen und der Bone bruise respektive die Knochenmarkkontusion als indirekte Zeichen für VKB-Rupturen in der MRT-Untersuchung interpretiert werden. Obwohl die diagnostische Kniegelenksarthroskopie aufgrund des gut darstellbaren vorderen Kreuzbandes samt Beschreibung der Art und Lokalisation etwaiger Läsionen als Goldstandard in der Diagnostik der VKB-Rupturen darstellt, ist die alleinige diagnostische Arthroskopie beim Verdacht eines Risses des vorderen Kreuzbandes aktuell obsolet.

1.4.4 Therapie der VKB-Ruptur

Für die Behandlung von VKB-Rupturen kommen sowohl konservative als auch operative Therapieformen in Frage, ohne dass diesbezüglich starre Kriterien festgelegt sind. So ist nach aktuellem wissenschaftlichen Erkenntnisstand nicht bei jedem Patienten die operative VKB-Versorgung notwendig. Individuell sollte analysiert werden, welche Stabilitätsanforderungen der Patient beziehungsweise die Patientin im täglichen Leben benötigt und inwiefern aus der VKB-Ruptur resultierende Beschwerden oder Folgeschäden auch konservativ minimiert werden können. Laut aktueller Fachliteratur kommt es jedoch beim instabilen Kniegelenk ohne operative Versorgung zu einem deutlich erhöhten Risiko für die

Entwicklung von sekundären Meniskusläsionen, wobei nach Levy *et al.* (2003) die 1-Jahres-Inzidenz 40%, die 5-Jahres-Inzidenz 60% und die 10-Jahres-Inzidenz 80% beträgt. Ein Nachweis, dass jede VKB-Ruptur zu sekundären Schädigungen beziehungsweise degenerativen Veränderungen im Kniegelenk führt, konnte bisher nicht erbracht werden.

Insbesondere für so genannte high risk pivoting-Sportarten bestehen deutlich erhöhte Raten an sekundären Läsionen. Diesbezüglich wiesen Fink *et al.* (2001) eine generelle Korrelation zwischen der Aktivität des Patienten mit bestehender Kniegelenksinstabilität und der Häufigkeit sekundärer Folgeschädigungen nach. Während eine Untersuchung von Johma *et al.* (1999) ergab, dass frühe (<12 Wochen nach der traumatischen Ruptur) VKB-Rekonstruktionen im Vergleich zu späten (>12 Wochen nach der traumatischen Ruptur) operativen Versorgung mit einer geringerer Arthrose-Rate von 11% versus 50% verbunden waren, zeigten Engebretsen *et al.* (2009), dass VKB-Risse mit begleitender Meniskusläsion (Gonarthrose-Inzidenz 48%) in einer deutlich erhöhten Rate für die Ausbildung einer posttraumatischen Gonarthrose gegenüber isolierten Rupturen des vorderen Kreuzbandes (Gonarthrose-Inzidenz 13%) resultieren. Somit könnten sowohl der Zeitpunkt der operativen Versorgung als auch das Vorliegen etwaige Begleit-Meniskopathien mutmaßliche Prädiktoren im Entstehungs-Mechanismus der posttraumatischen Gonarthrose darstellen. Die nachfolgende **Abbildung 2** – modifiziert nach Bauer *et al.* (2010) beziehungsweise Petersen *et al.* (2010) – skizziert die Verletzungs-Kaskade nach VKB-Trauma.

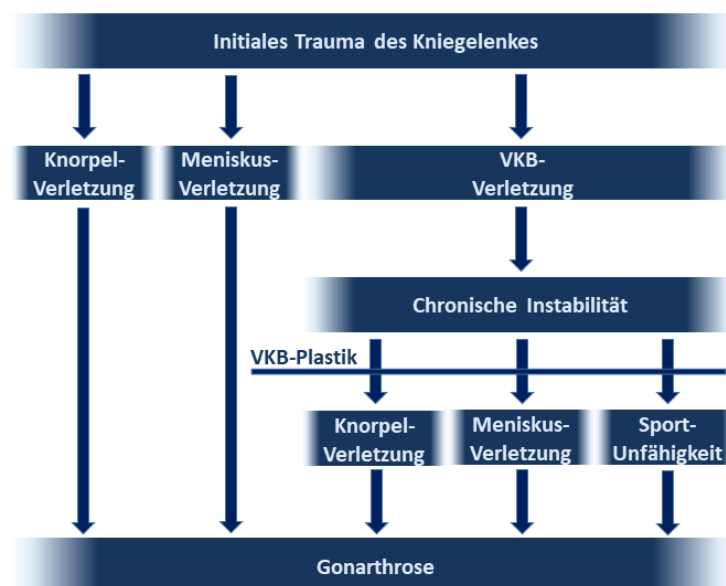


Abbildung 2: Verletzungs-Kaskade nach VKB-Trauma modifiziert nach Bauer *et al.* (2010) und Petersen *et al.* (2010)

Wie bereits erwähnt, können begleitende Verletzungen zusätzlich zur VKB-Ruptur auftreten. Die Inzidenz von parallel vorliegenden Meniskusläsionen lag je nach herangezogener Literaturquelle bei 15-50% (Levy *et al.*, 2003; Lohmander *et al.*, 2007), wobei die Schädigungen zu 56% am Meniscus lateralis, zu 37% am Meniscus medialis und in 7% beidseitig auftraten (Spindler *et al.*, 1993). Darüber hinaus wiesen Shelbourne *et al.* (2003) nach, dass ein erhöhtes Risiko für Knorpelverletzungen mit zunehmendem Alter der VKB-Ruptur und bei nachgewiesener Kniegelenksinstabilität vorliegt. Während in besagter Untersuchung bei frischen VKB-Rupturen in 23% der Fälle eine vor allem an der lateralen Femurkondyle lokalisierte chondrale Läsion zu beobachten war, ergab sich bei 54% der untersuchten Patienten mit chronischer, vorderer Instabilität der Nachweis eines oder mehrerer Knorpeldefekte. Desweiteren lagen nach Faber *et al.* (1999) bei Patienten mit Bone bruise-Zeichen in der MRT-Bildgebung in 57-66% der Fälle und bei einem Follow-up-Zeitraum von 6 Jahren nach VKB-Ruptur lokale chondrale Läsionen vor, obgleich eine Auswirkung dieser Chondromalazie auf das klinische Outcome-Ergebnis nicht nachgewiesen werden konnte.

Zur Beurteilung des Risikos für die Entwicklung einer Kniegelenksinstabilität beziehungsweise einer posttraumatischen Gonarthrose wurde die sogenannte surgical risk factor-Einteilung, mit dem Akronym SURF-Einteilung abgekürzt, entwickelt. In dieser Klassifikation fließen neben der mittels Instrumenten objektivierten, passiven Stabilität beziehungsweise Instabilität die berufliche und sportliche Aktivität sowie das Alter der VKB-verletzten Person ein, wodurch eine Risiko-Stratifizierung für eine operative VKB- oder Meniskus-Therapie im Verlauf resultiert.

Analog dazu entwickelten Fitzgerald *et al.* (2000) Indikatoren für ein operatives Vorgehen bei VKB-Ruptur. Hiernach ist bei Ergebnissen mit < 80% im Timed Hop-Test im Vergleich zur Gegenseite, bei ≥ 1 Giving way-Ereignissen, bei einem Resultat < 80% im Activities of Daily Living Scale-Test oder bei Werten < 60% in der Global Rating Knee Scale-Testung von einem schlechten Outcome bei konservativem Behandlungsregime einer VKB-Ruptur auszugehen. Basierend auf den vorhandenen Entscheidungsmodellen zur konservativen oder operativen Versorgung einer VKB-Ruptur entwickelten auch Bauer *et al.* (2010) für die Gesellschaft für Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin, kurz GOTS, ein klinisches Score-Verfahren, das in der nachfolgend abgebildeten **Tabelle 3** dargestellt ist.

	3 Punkte	2 Punkte	1 Punkt	0 Punkte
Initiale Begleitverletzungen	Per se OP-Indikation		Per se keine OP-Indikation	Keine Begleitverletzungen
Sportart (Innsbruck scale)		High risk pivot	Pivot	Low risk pivot
Sportliche Aktivität/Woche (Valderrabano scale)		Hoch, > 5 Stunden	Normal, 1-5 Stunden	Gering, < 1 Stunde
Subjektive Instabilität		Ja		Nein
Objektive Stabilität			Ja	Nein
Gelenkstatus: Beinachse, Degeneration, Bandlaxizität			Pathologien vorhanden	Unauffällig
Internistische Risikofaktoren			Ja (BMI erhöht)	Nein (BMI normwertig)
Berufliche Belastung			Kniebelastend	Nicht kniebelastend
Compliance			Ja	Nein
Punktwerte (Empfehlung zur operative versus konservative Therapie)	> 9 Punkte: OP-Indikation 6-8 Punkte: Individuelle Gewichtung und Entscheidung 0-5 Punkte: Tendenz zur konservativen Therapie			

Tabelle 3: Therapie-Entscheidung bei VKB-Rupturen nach GOTS, modifiziert nach Bauer et al. (2010)

Bei der Entscheidung zur konservativen Therapie einer VKB-Ruptur sollte eine suffiziente Behandlung und Nachkontrolle erfolgen. Hier sind neben abschwellenden Maßnahmen wie beispielsweise manueller Lymphdrainage und Kryotherapie gezielte physiotherapeutische Maßnahmen zum Koordinationstraining und Muskulaturaufbau notwendig, um die benötigte muskuläre und propriozeptive Kompensation der durch die VKB-Insuffizienz resultierenden, vorderen tibialen Instabilität zu erreichen. In den empfohlenen Kontrolluntersuchungen nach sechs Wochen, drei Monaten, sechs Monaten und einem Jahr sollte eine Reevaluation nach oben genanntem Schema erfolgen und bei Befundänderung auch trotz längerer Durchführung einer konservativen Therapie der notwendige Wechsel zum operativen Vorgehen getroffen werden.

Machen Begleitverletzungen wie komplexe Bandläsionen, dislozierten Meniskrisse, neurovaskuläre Pathologien oder Fragmentfrakturen eine zeitnahe operative Versorgung erforderlich, empfiehlt die aktuelle Fachliteratur eine All-in-one-Surgery anzustreben, obgleich dieses Vorgehen mit einem erhöhten Arthrofibrose-Risiko assoziiert ist. Das

therapeutische operative Management hat sich dabei in den vergangenen Jahrzehnten über extrakapsuläre Augmentationstechniken, primäre Kreuzbandnaht-Verfahren bis zur offenen und letztlich arthroskopischen Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes mittels Implantat beziehungsweise Transplantat weiterentwickelt, wodurch gemäß der Auswertungen von Benecke (2015) kontinuierliche, statistisch signifikant gebesserte Ergebnisse erzielt wurden.

Eine zentrale Stellung im Rahmen der operativen Versorgung nach Ruptur des vorderen Kreuzbandes nimmt die Transplantatwahl ein, wobei das Transplantat idealerweise dem nativen VKB ähnliche Struktureigenschaften, eine schnelle Inkorporation beziehungsweise Integration ohne Fremdreaktionen, eine möglichst schnelle Wiederaufnahme der Belastbarkeit und Koordination, eine geringe Entnahme-Morbidität und eine möglichst geringe Einschränkung durch Verlust der Transplantatsehne aufweisen sollte (Buchner *et al.*, 2010). Neben diesen Eigenschaften postulierten Fu *et al.* (2014) noch den langfristigen Funktionserhalt und eine bestmögliche Prävention einerseits einer Re-Ruptur und andererseits einer posttraumatischen, sekundären Gonarthrose als Kriterium für eine ideale VKB-Rekonstruktion.

Unter Berücksichtigung der zuvor genannten Anforderungen kommen nach Buchner *et al.* (2010) die Patellar-, die Semitendinosus-, die Gracilis- und die Quadrizepssehne sowie Allografts als Ersatzplastiken für das vordere Kreuzband in Frage, wobei die Allografts im klinischen Alltag eher eine untergeordnete Stellung einnehmen. Dabei konnten Fu *et al.* (2014) zeigen, dass die traditionelle Einzelbündeltechnik die Rotationsstabilität im Kniegelenk nicht ausreichend wiederzuerstellen vermag, weswegen bei der aktuellen Therapie versucht wird, exakt-anatomisch das zwei Bündel umfassende VKB mittels Doppelbündeltechnik zu rekonstruieren.

Die Patellarsehne als bone-tendon-bone-Transplantat galt und gilt bei vielen Chirurgen immer noch als der Goldstandard der VKB-Chirurgie und bietet neben einer hohen strukturellen Ähnlichkeit zum ursprünglichen Kreuzband ein sicheres Einheilen nach sechs Wochen und damit eine schnelle Nachbehandlungsmöglichkeit (Papageorgiou *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001). Nachteilig wirken sich jedoch die mögliche Entstehung eines vorderen Knieschmerzes, eine Narbenbildung, Sensibilitätsstörungen oder die Beeinflussung des Extensoren-Mechanismus aus. Auch die Verwendung der Hamstring-Sehnen in Form der Semitendinosus-Sehne oder als kombinierte Semitendinosus-Gracilis-Sehne erlaubt sowohl eine Einzelbündel- als auch eine Doppelbündel- oder sogar eine Vierfachbündel-Rekonstruktion mit ähnlichen Struktureigenschaften im Vergleich zum nativen VKB (Woo *et al.*, 1991). Dabei scheinen die Hamstring-Sehnen im Gegensatz zur Patellarsehne eine

vergleichsweise niedrigere Entnahme-Morbidität aufzuweisen. Da ein Semitendinosus-beziehungsweise Semitendinosis-Gracilis-Transplantat über keine Knochenblöcke verfügt, ist die ossäre Integration im Vergleich zur Patellarsehne verlangsamt. Zusätzlich konnten Buchner *et al.* (2010), Burks *et al.* (2005) und Tashiro *et al.* (2003) nachweisen, dass eine Schwächung der Innenrotations- und der Beugekraft aufgrund der Entnahme besagter Sehnen resultieren kann. Im Transplantat-Vergleich von Patellarsehne und Hamstrings zeigen sich bei gleicher subjektiver und klinischer Funktion nur in den kurz- bis mittelfristigen Vergleichen bessere Resultate in der objektiven Stabilitäts-Messung für die operative Versorgung mittels Patellarsehne, wohingegen sich langfristig keine signifikanten Unterschiede sowohl in der subjektiven als auch in der objektiven Stabilität zeigen (Biau *et al.*, 2007; Holm *et al.*, 2010; Liden *et al.*, 2007; Pinczewski *et al.*, 2007). Genauso resultieren in den Langzeitverläufen keine Divergenzen zwischen den Ergebnissen von Patellarsehne und Hamstring-Sehnen hinsichtlich der sportlichen Aktivität und Teilnahme, wobei sich in den kurz- bis mittelfristigen Resultaten tendenziell bessere Outcomes für die Patellarsehne ergeben (Biau *et al.*, 2007; Holm *et al.*, 2010; Liden *et al.*, 2007; Pinczewski *et al.*, 2007). Bei den mittels Patellarsehnen-Transplantat versorgten Patienten ergaben sich im Vergleich zu den Patienten mit der Hamstrings-Verwendung kurz-, mittel- als auch langfristig erhöhte Morbiditäten aufgrund der Transplantatentnahme, wobei sich auch die Raten an degenerativen radiologischen Veränderungen bei der Nutzung der Patellarsehne signifikant erhöht zeigten (Biau *et al.*, 2007; Holm *et al.*, 2010; Liden *et al.*, 2007; Pinczewski *et al.*, 2007).

Die Wahl der Quadrizepssehne als VKB-Ersatz kann mit und ohne Knochenblock erfolgen, wobei diese Sehne aufgrund gleichwertiger Ergebnisse und vergleichbaren strukturellen Eigenschaften zunehmend häufiger verwendet wird. Für die Nutzung der Quadrizepssehne als VKB-Plastik wird genauso wie bei der Verwendung der Patellarsehne die Beeinträchtigung des Streckapparates als nachteilig gesehen wird, wenngleich die Entnahme-Morbidität vergleichsweise geringer als beim Patellarsehnen-Transplantat zu sein erscheint (Chen *et al.*, 2006; Geib *et al.*, 2009; Gorschewsky *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004).

Da die Transplantate gleichwertig eingesetzt werden können, erfordert die Entscheidung eine individuelle Anpassung an das Anforderungsprofil des Patienten. Buchner *et al.* (2010) postulierten die in der nachfolgenden **Tabelle 4** dargestellten Faktoren als relevant.

Faktoren für die Transplantatwahl
Sportartspezifische Faktoren (Vorraussetzung der Integrität des Streckapparates oder der Rotationskraft; Berücksichtigung von spezifischen Entnahme-Morbiditäten; knieende Sportarten)
Berufliche Anforderungen (beispielsweise knieende Berufe; Berufe mit hockenden Anteilen)
Art, Ausmaß und Anspruch der körperlichen Aktivität
Präoperative Morbidität im Bereich der Entnahmestelle
Operateur-Erfahrung
Patienten-Wunsch

Tabelle 4: Faktoren für die Transplantatwahl modifiziert nach Buchner et al. (2010)

Die VKB-Ersatzplastiken nach isolierter Ruptur des vorderen Kreuzbandes sind mit 90% - 95% guten bis sehr guten – sowohl subjektiven als auch funktionellen – Ergebnissen überzeugend, wobei begleitende Schädigungen von Menisken oder Gelenkknorpel das radiologische und klinische Resultat oft signifikant limitieren. Die Versagerbeziehungsweise Re-Ruptur-Rate liegt bei ungefähr 10% laut Literatur (Holm *et al.*, 2010; Pässler, 2010), die objektive Stabilitätsrate bei 80% (Liden *et al.*, 2007). Insgesamt zeigen sich bei 60-80% der VKB-Plastik-versorgten Patienten keine signifikanten degenerativen Veränderungen (Pinczewski *et al.*, 2007), jedoch resultieren in isokinetischen Messungen unabhängig vom gewählten Transplantat Kraftdefizite hinsichtlich der Flexion und Extension. Diesbezüglich konnte sowohl drei Jahren (Ageberg *et al.*, 2009) als auch fünf Jahren (Lautamies *et al.*, 2008) nach operativer Versorgung noch eine persistierende Kraftminderung der Streckung und Beugung auf durchschnittlich 90% im Vergleich zur Kraft der kontralateralen Seite nachgewiesen werden.

1.4.5 Komplikationen nach operativer VKB-Versorgung

Die Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes birgt wie jeder chirurgische Eingriff die Gefahr von Komplikationen. Dabei können allgemeine OP-Risiken und eingriffsspezifische Komplikationen unterschieden werden.

Hinsichtlich der allgemeinen Komplikationen lassen sich diesbezüglich einerseits die postoperative Gelenkinfektion im Sinne einer septischen Gonitis, der oberflächliche Wundinfekt, die Wundheilungsstörung und die Keloidbildung unterscheiden und andererseits das Auftreten eines Morbus Sudeck, einer tiefen Beinvenenthrombose oder von postoperativen Schmerzen und Bewegungseinschränkungen nennen. Darüber hinaus sind bei allen chirurgischen Interventionen die Gefahr einer Verletzung von Gefäßen,

Nerven, Knochen, Muskeln und Sehnen sowie einer möglichen Hämatom- oder Hämarthros-Bildung gegeben.

Die spezifischeren Komplikationen nach VKB-Rekonstruktionen beziehen sich auf das angewandte Operationsverfahren, auf das Zugangsgebiet und auf die Wahl des verwendeten Transplantates. Hier sind als Komplikationen vor allem die persistierende beziehungsweise erneut auftretende subjektive oder objektive Instabilität, die Gefahr der Re-Rupturierung sowie der Arthrofibrose-Ausbildung zu nennen. Darüber hinaus können Patellafrakturen oder eine Gelenkankylose als OP-Risiko angesehen werden, obgleich diese Komplikationen sehr selten auftreten.

Obwohl die Ersatzplastik des vorderen Kreuzbandes – wie im vorherigen Kapitel beschrieben – gute bis sehr gute Resultate sowohl in subjektiver als auch in objektiver Betrachtung liefert, liegt die Versager- beziehungsweise Re-Ruptur-Rate bei 10% (Holm *et al.*, 2010; Pässler, 2010) und das Risiko für Transplantat-Versagen bei 0,7% – 8% je nach verwendeter Fachliteratur (Fagelman *et al.*, 2005; Wetzler *et al.*, 1996). Freiling *et al.* (2006) und Harner *et al.* (1992) geben die Komplikations-Rate einer möglichen Bewegungseinschränkung bei 11% – 26% an. Nach Weigl (2002) und Pässler *et al.* (1995) treten Infektionen in 4,3%, postoperative Beinvenenthrombosen in 1,2% und persistierende Bandinstabilitäten in 4,3% der Fälle nach VKB-Rekonstruktion auf. Die aufgeführten unterschiedlichen Raten an Komplikationen resultieren aufgrund einer fehlenden allgemeinen Definition für eine misslungene VKB-Plastik. Nach Johnson *et al.* (1995) werden die erneute Instabilität und die schmerzhaft oder eingeschränkte Flexion bei stabilem Gelenk als Kriterien für eine fehlgeschlagene Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes zugrunde gelegt. Diese Definition wird von Allen *et al.* (2003) um die Arthrofibrose-Bildung, die pathologische Bandlaxizität, die Extensorendysfunktion und die posttraumatische Gonarthrose erweitert.

Die Genese der gescheiterten VKB-Plastiken ist vielfältig und kann multifaktoriell sein, wobei Fagelman *et al.* (2005) in die Kategorien chirurgische Fehler, biologisches Transplantatversagen durch mangelnde Einheilung und traumatische Re-Ruptur unterteilen. Nach Carson *et al.* (2004) sind chirurgisch-technische Fehler (falsche Bohrkanalplatzierung, unzureichende Notchplastik mit resultierendem VKB-Impingement, unzureichende Transplantat-Spannung, inadäquate Transplantat-Fixation) in 52% für ein Scheitern der VKB-Plastik verantwortlich. Darüber hinaus sorgen neuerliche Traumata mit erneuter VKB-Ruptur bei 25% der Patienten für das Misslingen der VKB-Rekonstruktion. Bei 8% der Fälle zeigt sich eine fehlgeschlagene Transplantat-Inkorporation beziehungsweise Transplantat-Integration für eine misslungene Rekonstruktion des

vorderen Kreuzbandes verantwortlich und bei 3% der VKB-versorgten Patienten führen eine Arthrofibrose-Entwicklung oder eine persistierende Bewegungseinschränkung zum Scheitern der operativen Versorgung (Carsen *et al.*, 2004). Diese unterschiedlichen Ätiologien der fehlgeschlagenen VKB-Plastik bedürfen spezifischer Maßnahmen, unter anderem ist ein Revisionseingriff mit erneutem Kreuzband-Rekonstruktions-Versuch zu evaluieren.

1.4.6 Knochen-Sehnen-Integration und Transplantat-Inkorporation

Wie im vorherigen Kapitel detailliert beschrieben wurde, stehen chirurgischen Fehler an erster Position und traumatische Re-Rupturen an zweiter Stelle für die Ursache von misslungenen VKB-Plastiken. Der dritte Platz der Genese erfolgloser Rekonstruktionen des vorderen Kreuzbandes wird vom fehlgeschlagenen, unzulänglichen Einwachsen des Transplantates mit einem Anteil von bis zu 8% (Carson *et al.*, 2004) eingenommen. Daher ist neben der Verbesserung der chirurgischen Techniken die Gewährleistung einer komplikationslosen und schnellen biologischen Inkorporation des Transplantates für den Behandlungserfolg essentiell. In diesem Sinne stellt die ossäre Integration des VKB-Transplantates in den Bohrkanaal ein wissenschaftliches Thema zunehmender Bedeutung und Beliebtheit dar. Dabei ist es für das Management der Knochen-Sehnen-Einheilung und der Wiederherstellung einer physiologischen ossären Sehnen-Integration absolut notwendig, ein Verständnis für die komplexen mikroskopischen und extra-beziehungsweise intrazellulären Vorgänge und Interaktionen im Interface-Bereich zwischen Sehnen- und Knochengewebe zu entwickeln.

Physiologischerweise zeigt das menschliche vordere Kreuzband am Übergang zu Femur und zur Tibia, also im Bereich der Knochen-Sehnen-Integration, einen abweichenden, mikroskopischen Aufbau im Vergleich zum intraartikulären Abschnitt auf, welcher einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie ein Faserknorpel aufweist (Petersen *et al.*, 2002).

Im Allgemeinen lassen sich bei der knöchernen Insertion von Bändern einerseits die fibröse Bandinsertion – auch als indirekte beziehungsweise periostal-diaphysäre Bandinsertion bezeichnet – und andererseits die fibrocartilaginäre Bandinsertion – auch unter dem Begriff der direkten oder chondral-apophysären Bandinsertion bekannt – unterscheiden. Des Weiteren wird häufig der lateinische Begriff der Enthesis stellvertretend für die Bandinsertion beziehungsweise für den knöchernen Sehnenansatz verwendet.

Bei der fibrösen Bandinsertion zeigt sich eine membranartige Perforation der Sehne oder des Bandes in das Periost, wobei die Verbindung der Gewebe über eine an Kollagenfasern reiche Bindegewebsschicht zustande kommt. Diese perforierenden, mineralisierten, kollagenen Fasern werden nach dem Entdecker auch als Sharpey-Fasern bezeichnet. Die indirekte Bandinsertion zeigt sich vor allem in Bereichen mit geringer Kraftübertragung und mit zumeist großen Insertionsflächen und stellt sich im Vergleich zur direkten Insertion qualitativ schwächer dar (Benjamin *et al.*, 1986). Dabei kann sich die Insertion sowohl ossär als auch periostal darstellen und findet sich beispielsweise beim Ansatz des Musculus deltoideus am Humerus oder beim Ansatz des Musculus adductor magnus an der Linea aspera femoris.

Im Gegensatz zur fibrösen Bandinsertion entspringen die Bandstrukturen bei der fibrocartilaginären Bandinsertion direkt aus dem Periost, so dass sich am Ansatzpunkt des Bandes keine periostale Abgrenzung zeigt. Solche fibrocartilaginären Sehnenansätze befinden sich zumeist in Bereichen großer Kraftübertragung und kleiner Insertionsareale. Dementsprechend inseriert das menschliche vordere Kreuzband sowohl femoral als auch tibial in Form einer direkten Bandinsertion am Knochen (Apostolakos *et al.*, 2014). Auch bei den Ansätzen des hinteren Kreuzbandes, der Patellarsehne oder der Supraspinatussehne handelt es sich um fibrocartilaginäre Bandinsertionen.

Typischerweise stellt sich die fibrocartilaginäre Enthese mikroskopisch mit einem vierstufigen Aufbau dar, der sich laut Petersen *et al.* (2002) in eine Band-Zone, eine Faserknorpel-Zone, eine Kalkknorpel-Zone und eine Knochen-Zone unterteilt. Auch Apostolakos *et al.* (2014) beschreiben in ihrer Übersichtsarbeit die Differenzierung der fibrösen Bandinsertion in vier Zonen, welche in Gesamtschau einen kontinuierlichen, strukturellen Gradienten von unkalzifiziertem Sehnengewebe hin zu kalzifiziertem Knochengewebe formieren.

Die **Tabelle 5** zeigt einerseits die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, nachfolgend auch mit EZM abgekürzt, und andererseits die Bedeutung der einzelnen Zonen innerhalb einer fibrocartilaginären Bandinsertion (modifiziert nach Apostolakos *et al.* (2014)).

Zone	EZM-Zusammensetzung	Bedeutung
Zone 1 Dichtes fibröses Bindegewebe	Fibroblasten Kollagen Typ I, Typ III	Mechanische Eigenschaften entsprechen denen normaler Sehnen mit linear angeordneten Kollagenen
Zone 2 Unkalzifizierter Faserknorpel	Fibrochondrozyten Proteoglykan, Aggrecan mit Kollagen Typ I, Typ II, Typ III	Zunehmendes Verschwinden der Kollagenfasern im Sehnengewebe
Übergang / Grenzlinie (Tidemark)	Basophile Demarkation zwischen unkalzifiziertem und kalzifiziertem Faserknorpel, repräsentiert den Grenzbereich zwischen weichem und hartem Gewebe, auch als „blue line“ bezeichnet	
Zone 3 Kalzifizierter Faserknorpel	Fibrochondrozyten Kollagen Typ II (überwiegend), Typ I und Typ X	Unregelmäßiges Inserieren in das Knochengewebe erzeugt die mechanische Integrität der Enthese („Verzahnung“)
Zone 4 Knochengewebe	Osteozyten Osteoblasten / Osteoklasten Kollagen Typ I	Stellt die Insertionsfläche für die Sehne zur Verfügung

Tabelle 5: Zonen-Unterteilung der fibrokartilaginären Bandinsertion modifiziert nach Apostolakos et al. (2014)

Der besagte Aufbau der fibrokartilaginären Enthese mit kontinuierlichem Übergang von weichem Band- beziehungsweise Sehnengewebe zum harten Knochengewebe und der unregelmäßigen, diffusen Verzahnung von Knochen, kalzifiziertem Knorpel und unkalzifiziertem Knorpel ermöglicht als Ganzes die lückenlose und sukzessive Kraftübertragung auf die knöchernen Strukturen. Darüber hinaus verlaufen kollagene Fasern vom Knochen ausgehend bis in das Bandgewebe, wobei sich diese Fasern polytom zwischen den Fibrochondrozyten verzweigen. Dadurch fungieren die eingelagerten Knorpelzellen als mikroskopische Umlenkrollen und bilden in ihrer Gesamtheit eine Art Federsystem zum effektiven Auffangen und zum gleichmäßigen Verteilen von Zug- und Scherkräften.

Unterschiedliche Studien zeigen, dass Verletzungen fibrokartilaginärer Bandinsertionen, wie beispielsweise bei einer VKB-Ruptur, zur Bildung von fibrovaskulärem Narbengewebe führen und die Wiederherstellung der nativen Knochen-Sehnen-Insertion, insbesondere die Regenerierung der zuvor genannten vier Zonen, ausbleibt (Apostolakos *et al.*, 2014). Weiterhin resultiert durch den Heilungsprozess einerseits ein mechanisch schwächeres und andererseits ein für erneute Verletzungen anfälligeres Narbengewebe. Dabei lässt sich dieser Heilungsablauf, der eine mechanische Belastung benötigt und zudem auch bestimmte biologische Rahmenbedingungen voraussetzt, in drei Phasen einteilen: die Inflammation, die Reparatur und das Remodeling.

Im Anschluss an eine VKB-Rekonstruktion kommt es in der inflammatorischen Phase (0-7 Tage, meist ab dem 4. Tag) zu einer Thrombozyten-vermittelten Ablagerung und

Anreicherungen von Fibrin und Fibronectin sowie durch an die Verletzungsstelle migrierende neutrophile Granulozyten und Makrophagen zur Ausschüttung von Zytokinen wie beispielsweise dem insulin-like growth factor 1, kurz IFG-1, dem platelet-derived growth factor, kurz PDGF, und dem transforming growth factor β , kurz TGF- β (Apostolakos *et al.*, 2014). Diese zellulären Aktivitäten einerseits und die Sekretion von Zytokinen andererseits führen zusammen zur Ausbildung eines granulofibrösen Narbengewebes, welches das VKB-Transplantat mit dem Knochen konnektiert. Der Übergang in den nächsten Einheilungs-Abschnitt – also in die Reparatur-Phase – kommt durch eine Makrophagen-vermittelte Sekretion von TGF- β 1 zustande und siedelt sich zeitlich ungefähr nach 5-14 Tagen an (Apostolakos *et al.*, 2014). Aufgrund dieser TGF- β 1-Ausschüttung resultiert einerseits eine Proliferation von Fibroblasten und andererseits eine Bildung von Narbengewebe, wobei anschließend ein Matrix-Metalloproteinase-vermitteltes Remodeling ab dem 14. Tag stattfindet. Diesbezüglich zeigt sich nach frühestens zwei Wochen die Produktion von kollagenen Fasern mit vorwiegend Typ II- und Typ III-Kollagenen im Bereich des Interfaces zwischen Knochen und Sehne (Ambrock, 2013). Darüber hinaus kann ab der dritten Woche der ossären Sehnen-Integration eine zunehmende Revaskularisierung des Transplantates beobachtet werden, die bis zur sechsten bis achten Woche eine vollständig vaskularisierte synoviale Einhüllung des Transplantates bewirkt und ab der 20. Woche zu einer intrinsischen Vaskularisierung des Transplantates führt (Ekdahl *et al.*, 2008). Durch die neu gebildende Gefäßversorgung kommt es zur zellulären Re-Population mit mesenchymalen Stammzellen und regenerativen Fibroblasten, wobei dieser Prozess in Abhängigkeit der Anwesenheit hinreichender Wachstumsfaktoren zumeist bis zum Ende der zwölften Woche abgeschlossen ist (Menetrey *et al.*, 2008). Dabei zeigte sich die Differenzierung der mesenchymalen Vorgängerzellen in Untersuchungen von Chen (2009) von mechanischen Faktoren wie dem auf die Zellen ausgeübten Druck und die Zugspannung in der umliegenden extrazellulären Membran abhängig. Im weiteren Heilungsverlauf kommt es an der fibrovaskulären Grenzfläche zur Ausbildung von Sharpey-Fasern, darüber hinaus ist eine zunehmende Mineralisierung der EZM zu beobachten. Das Transplantat wird in den peripheren Schichten sukzessive von Osteozyten, Osteoblasten beziehungsweise Osteoklasten durchzogen und so mehr und mehr in den Knochen integriert. Durch die Wiederansiedlung von Knochenzellen und Kollagenfasern resultiert letztlich eine Restaurierung des Knochen-Sehnen-Interfaces, wobei nach einem Zeitraum von ungefähr 30 Wochen der Kollagen Typ III-Gehalt des Transplantates mit einem Anteil von 10% dem des nativen vorderen Kreuzbandes entspricht (Chen, 2009). Dieses so genannte kollagene Remodeling, auch als Ligamentisation bezeichnet, sorgt für eine Anordnung der

Kollagenfasern wie im ursprünglichen nativen Kreuzband bei jedoch fehlenden propriozeptiven Sensoren. Die histologischen Veränderungen im Transplantat hängen den Modifikationen am Knochen aufgrund der erst später erfolgten Vaskularisierung zeitlich hinterher, weshalb das Transplantat infolge der intrinsischen Umbauvorgänge nach ungefähr sechs Wochen des Heilungsprozesses die geringste Steifheit und Reißfestigkeit aufweist (Ekdahl *et al.*, 2008). Im Bohrkanal kommt es durch Migration und Aktivierung knorpelartiger Zellen zum Umbau des fibrovaskulären Granulationsgewebes mit sukzessiver Einlagerung von Kollagen Typ II in die extrazelluläre Matrix. An den Bohrkanal-Wänden finden Heilungsprozesse ähnlich der enchondralen Ossifikation statt, wohingegen im Bohrkanal-Inneren selbst Reparaturvorgänge vergleichbar zur Frakturheilung zu beobachten sind (Ambrock, 2013).

Zusammengefasst stellt die ossäre Integration beziehungsweise Inkorporation des Sehnen-Transplantates nach VKB-Ersatzplastik einen komplexen Prozess dar, insbesondere hinsichtlich der biologischen Mechanismen, der Zell-Zell-Interaktionen und der mechanischen Erfordernisse. Darüber hinaus nehmen verschiedene Stimulations- und Wachstumsfaktoren eine entscheidende Stellung für eine erfolgreiche Knochen-Sehnen-Integration ein, wobei aktuelle Forschungsergebnisse neben der Fokussierung auf TGF- β , IGF und PDGF vor allem der Familie der Bone Morphogenetic Proteins eine zentrale Bedeutung im Einheilungsprozess attestieren und positive Effekte durch extrinsische Applikation besagter Proteine vermuten.

1.4.7 An der Knochen-Sehnen-Integration beteiligte Zellen

Bei den im Abschnitt **1.4.6 Knochen-Sehnen-Integration und Transplantat-Inkorporation** detailliert beschriebenen Prozessen der ossären Integration beziehungsweise Inkorporation eines VKB-Transplantates nehmen mit den Osteoblasten und den Fibroblasten zwei Zellarten herausragende Rollen ein, weshalb in diesem Unterkapitel genauer auf diese Zellen, auf ihr Zusammenspiel und auf die Bildung von reifer Knochenmatrix beziehungsweise Sehnen- oder Bändergewebe eingegangen wird.

Knochengewebe ist eine Komposition aus größtenteils Hydroxylapatit-Kristallen, unterschiedlichen Zellen und verschiedenen Arten extrazellulärer Matrix, welche auch als Knochenmatrix bezeichnet werden. Der Knochenhaushalt wird geregelt über die knochenaufbauenden Osteoblasten, die knochenabbauenden Osteoklasten und die teilungsunfähigen, Knochenmatrix-erhaltenden Osteozyten. Letztere Zellen entwickeln sich aus osteoblastischen Vorgänger und sind zudem an der Calcium-Homöostase beteiligt.

Osteoblasten gehen genauso wie Myoblasten, Chondrozyten und Adipozyten aus gemeinsamen, pluripotenten Progenitor-Zellen hervor. In Abhängigkeit bestimmter exogener Signalmoleküle oder Zytokine entwickeln sich die mesenchymalen Progenitor-Zellen über die Aktivierung spezifischer Zielgenen zu ausdifferenzierten Zellen. Die nachfolgende **Abbildung 3** zeigt die Differenzierungs-Möglichkeiten der Progenitor-Zellen in Abhängigkeit von exogenen Einflüssen (aus Dirckx *et al.*, 2013).

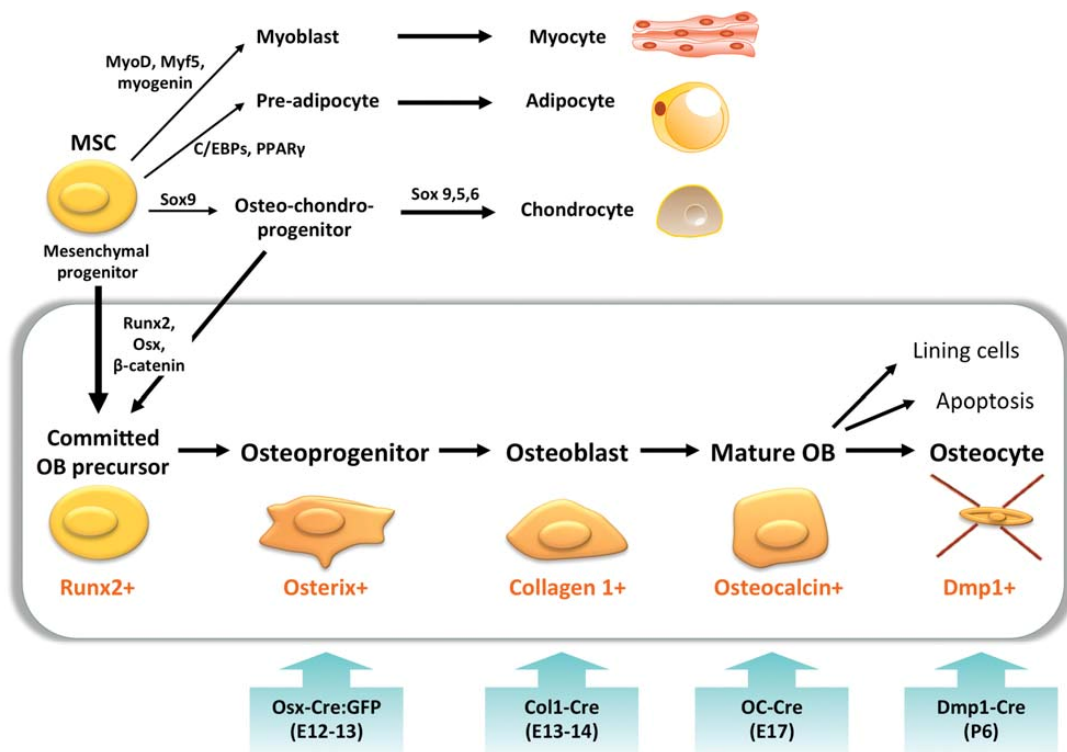


Abbildung 3: Differenzierungs-Möglichkeiten mesenchymaler Progenitor-Zellen (aus Dirckx *et al.*, 2013)

Die Knochenmatrix wird gebildet aus zahlreichen Proteinen, welche sukzessive und in einem festgelegten Ablauf durch die osteoblastischen Zellen sezerniert werden. Hier sind allen voran das Kollagen Typ I (Col1), die Alkalische Phosphatase (Alp), das Osteocalcin (Ocn), auch als bone-γ-carboxyglutamic acid-containing protein (Bglap) bezeichnet, das Osteonectin und das Osteopontin (Opn), auch als secreted phosphoprotein 1 (Spp1) bezeichnet, sowie mehrere Sialoproteine und Proteoglykane zu nennen. Nach initialer, über den Runt-related transcription factor 2 (Runx2) vermittelter Bglap-Sekretion führt die Bindung von Calcium-Ionen im Knochen zur Sezernierung von Alp aus den Osteoblasten (Katagiri *et al.*, 2002). Durch die Alp-Sekretion wird eine lokale Phosphat-Ionen-Konzentrationserhöhung ausgelöst, welche ihrerseits die zuvor bereits gesteigerte Konzentration von Calcium-Ionen zusätzlich erhöht und damit den Mineralisierungsprozess triggert (Ambrock, 2013). Durch Exozytose von Alp- und

Pyrophosphatase-enhaltenden Vesikeln erfolgt im intraossären Raum die enzymvermittelte chemische Verbindung von Calcium- und Phosphat-Ionen zu Calciumphosphat und durch dessen Kristallisierung die weitere kaskadenartige Mineralisierung mittels Bildung und Ablagerung von Hydroxylapatit-Kristallen (Katagiri *et al.*, 2002). Die nachfolgende **Abbildung 4** zeigt das zeitabhängige Auftreten der unterschiedlichen, als Expressionsmarker verwendbaren sezernierten Proteine im Rahmen der Osteoblasten-Differenzierung in einer *in vitro*-Kultur (aus Khurana, 2016).

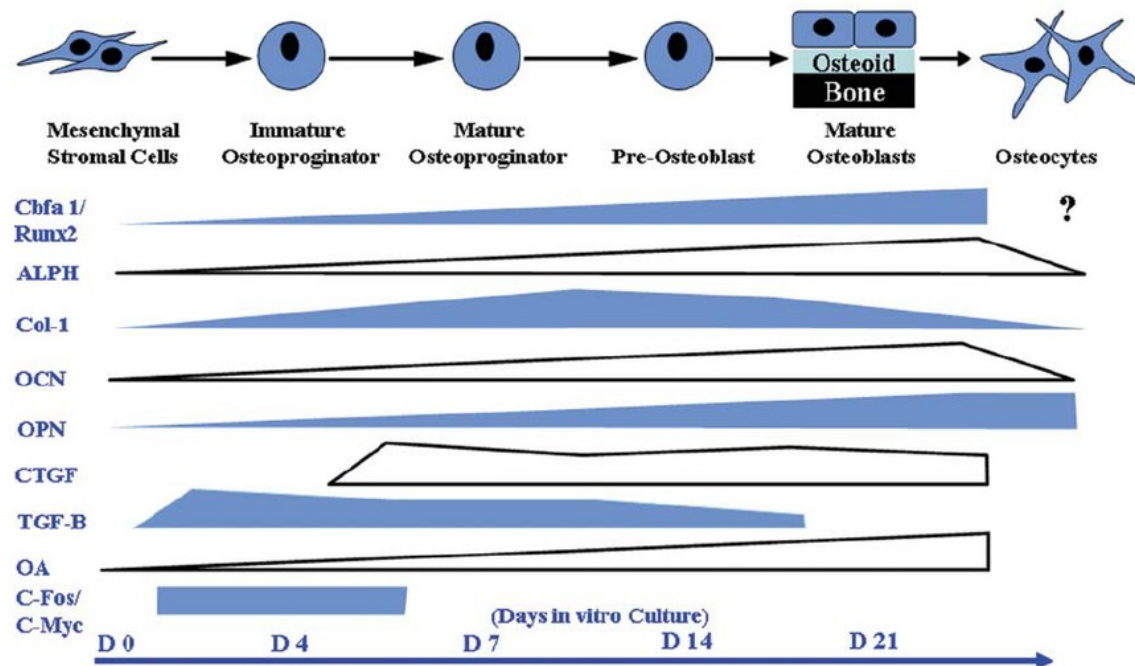


Abbildung 4: Zeitabhängiges Auftreten unterschiedlicher Expressionsmarker im Rahmen der Osteoblasten-Differenzierung (aus Khurana, 2016)

Sehnen- beziehungsweise Bändergewebe besteht vorwiegend aus zugfesten Kollagenfasern, wobei insbesondere das Kollagen Typ I und Typ III vorherrschen. Während bei Sehngewebe die Kollagenfasern parallel gebündelt angeordnet sind, ist die Strukturierung der kollagenen Fasern in Bändern weniger geordnet (Ambrock, 2013). Dabei sind sowohl im Sehngewebe als auch im Bändergewebe die als Tendinozyten bezeichnete Fibroblasten reihenweise zwischen den Bündeln angeordnet und von einer eigenen spezialisierten extrazellulären Membran umgeben. Die Fibroblasten sind ebenso wie die zuvor genannten Osteoblasten mesenchymalen Ursprungs und gehen aus myofibroblastischen Progenitorzellen hervor. Die besagten fibroblastischen Zellen dienen vor allem der Synthese von unterschiedlichen Kollagenen und nehmen damit eine Schlüsselrolle in der Erzeugung elastischer oder retikulärer Fasern ein (Wang *et al.*, 2007). Darüber hinaus werden weitere, die Zugfestigkeit erhöhende Anteile der extrazellulären Membran durch Fibroblasten gebildet. Hier sind beispielsweise die Proteoglykane, die

Glykosaminoglykane und das Protein Aggrecan zu nennen. Nach Bildung der extrazellulären Membran gehen die aktiven Fibroblasten innerhalb der extrazellulären Membran in die als Fibrozyten bezeichnete inaktive Ruheform über, welche bei erneuter Notwendigkeit im Rahmen von Wundheilungs- und Wachstums-Situationen oder bei Gewebsmodullierungs-Prozessen reaktiviert werden können (Ambrock, 2013).

1.5 Bone Morphogenetic Proteins

Als Wachstumsfaktoren werden Proteine bezeichnet, die auf andere Zellen autokrin, parakrin oder endokrin wirken können. Sie und ihre Rezeptoren nehmen eine zentrale Rolle in der Regulation komplexer Prozesse wie beispielsweise der Zell-Proliferation, der Apoptose oder der Zell-Differenzierung ein und gewährleisten die Integrität und Homöostase von Zellen, Geweben und Organen. Durch die bedeutende Stellung können qualitative beziehungsweise quantitative und genetische oder epigenetische Veränderungen der Wachstumsfaktoren zu einer Protoonkogen-Aktivierung beziehungsweise zu einer Tumorsuppressorgen-Inaktivierung führen, wodurch Störungen wichtiger intrazellulärer und extrazellulärer Kontrollmechanismen resultieren und Tumorerkrankungen entstehen können. Aufgrund der großen Anzahl an Wachstumsfaktoren werden diese Substanzen beruhend auf strukturellen oder funktionellen Verwandtschaften zu geordneten Superfamilien und Familien zusammengefasst.

Im Jahr 1965 wies Urist (Urist, 1965) die Fähigkeit dekalzifizierter, avitaler Knochenmatrix zur Bildung von ektopen Knochengewebe in Muskelgewebe nach und postulierte die Existenz einer osteoinduktiven Substanz. Nachdem Reddi (1981) ebenfalls diese ektopen, de novo Knochenbildung auf Grundlage injizierter demineralisierter Knochenmatrix sowohl enchondral als auch direkt desmal beobachtete und in seiner Interpretation die Existenz einer Gruppe osteoinduktiver Stoffe voraussagte, gelangen Wozney *et al.* (1989) die erstmalige Sequenzierung der osteoinduktiven Proteine, womit er die Aufmerksamkeit der medizinischen und molekularbiologischen Forschung auf diese Enzym-Familie lenkte. Die multifunktionalen Bone Morphogenetic Proteins, in kurzer Form als BMP (Singular) beziehungsweise als BMPs (Plural) bezeichnet, waren geboren.

1.5.1 TGF- β -Superfamilie

Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) werden genauso wie die namensgebenden Transforming Growth Factors- β (TGF- β s), die Growth and Differentiation Factors (GDFs), die Activinen, die Inhibinen, die Müllerian Inhibiting Substance (MIS) und dem am weitesten entfernten Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF) zur Transforming Growth Factor- β -Superfamilie hinzugerechnet. Nach Chang *et al.* (2002) fungieren die Mitglieder dieser TGF- β -Superfamilie als sekretierte Wachstumsfaktoren mit parakriner Wirkung und regulieren die Homöostase sowie Entwicklung nahezu aller Gewebe und Organe. Die grundlegende Wirkung dieser Zytokine erfolgt dabei über die extrazelluläre Bindung des

Proteins an ein integraler Membranprotein mit Serin-Threonin-Kinase-Aktivität, wobei mittels einer Phosphorylierungs-Kette eine Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen aus der Gruppe der Smad-Proteine bewirkt wird. Im Anschluss führen die besagten Smad-Proteine zu einer Signalkaskade mit Bildung oder Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit zu einer Modifikation auf transkriptioneller Ebene. Die nachfolgende **Abbildung 5** zeigt eine Übersicht über die am humanen TGF- β -Pathway beteiligten Signalmoleküle, Liganden und Smad-Proteine (aus Moustakas *et al.*, 2009).

Pathway	BMP	GDF	Activin	TGF β	AMH	Inhibitors
Ligand	BMP2, 4 BMP5, 6, 7 BMP8A, 8B BMP9, 10	GDF5, 6, 7 GDF9b GDF10, 11 GDF15 (MIC1) GDF1, 3 GDF8 (MYO) GDF9	Inhibin β A Inhibin β B Nodal	TGF β 1 TGF β 2 TGF β 3	AMH (MIS)	BMP3 Inhibin α Inhibin β C Inhibin β E LEFTYA LEFTYB
RII	BMPRII ActRIIA, ActRIIB	BMPRII ActRIIA, ActRIIB	ActRIIA ActRIIB	T β RII	AMHRII	N/A
RI	BMPRIA (ALK3) BMPRIIB (ALK6) ALK2 ALK1	BMPRIA (ALK3) BMPRIIB (ALK6) ALK2 ActRIB (ALK4) ALK7 T β RI (ALK5)	ActRIB (ALK4) ALK7	T β RI (ALK5) ALK1 ALK2 BMPRIA (ALK3)	BMPRIA (ALK3) BMPRIIB (ALK6) ALK2	N/A
RIII	RGMa, b, c (+)	Cripto 3 (+)	Cripto 3 (-) Cripto 1 (+)	T β RIII (+) Endoglin (+) Cripto 3 (-)	?	T β RIII (-) Cripto 3 (-)
R-Smad	SMAD1, 5, 8	SMAD1, 5, 8 SMAD2, 3	SMAD2, 3	SMAD2, 3 SMAD1, 5, 8	SMAD1, 5, 8	N/A
Co-Smad	SMAD4	SMAD4	SMAD4	SMAD4	SMAD4	N/A
I-Smad	SMAD6, 7	SMAD6, 7	SMAD7	SMAD7	SMAD6, 7	N/A

Abbildung 5: Übersicht über die Signalmoleküle und Liganden im TGF- β -Pathway (aus Moustakas *et al.*, 2009)

1.5.2 BMP-Subfamilie

Innerhalb der TGF- β -Superfamilie lässt sich die Gruppe der Bone Morphogenetic Proteins zu einer Subfamilie zusammenfassen, wobei von Chubinskaya *et al.* (2003) mehr als 47 verschiedene BMPs bisher identifiziert und charakterisiert wurden. Dabei sind diese Wachstumsfaktoren in einer Vielzahl zellulärer Signalwegen involviert und nehmen eine zentrale Stellung in der Entwicklung der Nieren, des Nervensystems und des Skelettsystems sowie in der postnatalen Knochenentwicklung ein.

Die Synthese der BMPs erfolgt initial über lange, monomere Präproproteine mit einer Aminosäuren-Länge von 400-450 Aminosäuren, welches anschließend nach Aufnahme in das endoplasmatische Retikulum prozessiert wird. Hier erfolgt die Bildung einer charakteristischen Cystein-Domäne, wonach es über Bildung intermolekularer Disulfidbrücken zu Dimerisierung zweier BMP-Monomere kommen kann. Dabei konnten Israel *et al.* (1996) zeigen, dass die heterodimeren BMP-Moleküle im Vergleich zum BMP-

Monomer eine größere biologische Aktivität besitzen. Das kovalent gebundene, BMP-typische Heterodimer stellt ein Proprotein dar, welches proteolytisch gespalten und dadurch in die biologisch aktive, mature Dimer-Form bestehend aus annähernd 120-140 Aminosäuren und sieben Cysteinresten überführt wird. Über einen vesikulären Transport zur Zellmembran und nachfolgender Exozytose werden die BMP-Homodimere in den Extrazellulärraum sezerniert, in welchem die zu den niedermolekularen Glykoproteinen zählenden BMPs ihre parakrine Wirkung entfalten können.

Die BMPs weisen untereinander strukturelle Ähnlichkeiten auf, besitzen jedoch unterschiedliche spezifische Funktionen. Entsprechend der Untersuchungen von Marsell *et al.* (2009) und Granjeiro *et al.* (2005) lassen sich aufgrund der chemischen Struktur vier Untergruppen unterteilen. Analog zur Signaltransduktion der Proteine in der TGF- β -Superfamilie vermitteln die Mitglieder der BMP-Subfamilie ihre Wirkung über extrazelluläre Bindung an Transmembranproteine, welche ihrerseits eine intrazelluläre Signalkaskade über Smad-Proteine auslösen und in einer Veränderung des Transkriptoms der Zielzelle resultieren.

Nach bisherigem Forschungsstand werden dabei vor allem dem BMP2 und dem BMP7 entscheidende Rollen in der Skelettsystem-Entwicklung zugeschrieben. Nach Kirchhoff (2014) gelten sie insbesondere als potente Induktoren des Knorpel- und Knochenwachstums und sind maßgeblich an der Modellierung des embryonalen Knorpelskelettes und an der Extremitäten-Entstehung beteiligt. Im Rahmen von murinen Nullmutanten-Experimenten von Dudley *et al.* (1995) und Zhang *et al.* (1996) zeigten sich für die BMPs weitaus vielschichtiger Aufgaben. So resultierten bei Mäusen mit besagter BMP-Nullmutation Defekte der Amnion-, der Herz-, der Nieren- und der Augen-Entwicklung und die betroffenen Mäuse waren nicht überlebensfähig.

Sowohl BMP2 als auch für BMP7 sind in rekombinanter Form in der medizinischen Anwendung zugelassen, wobei die besagte rekombinate Form über das Präfix „rh“ gekennzeichnet wird. Während rhBMP2 als Präparat Diboterminalfa einerseits bei Störungen der Knochenheilung und bei Pseudarthrosen-Bildung und andererseits in der Wirbelsäulenchirurgie klinische Verwendung findet, ist rhBMP7 unter dem Namen Eptoterminalfa für der Behandlung von Tibia-Pseudarthrosen zugelassen.

1.5.3 BMP-Rezeptoren, BMP- und Smad-Signaltransduktion

Wie zuvor bereits beschrieben, sind BMPs im menschlichen Körper an einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse beteiligt. Dabei reicht die biologische Aktivität von der Regulierung der zellulären Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose über die

Migration von Zellen bis hin zur Steuerung der embryonalen Entwicklung sowie der Aufrechterhaltung der Homöostase gesamter Gewebe. Um die Fülle dieser unterschiedlichen Effekte bewirken zu können, bedarf es einer exakten und fein regulierbaren Signaltransduktion und damit einer großen Variation von BMPs. Diese binden von extrazellulär über so genannte Liganden-Rezeptoren-Interaktionen an die zahlreichen BMP-Rezeptoren.

Die BMP-Rezeptoren wirken als Serin-Threonin-Kinasen und lassen sich primär in den BMP-Rezeptor Typ I und den BMP-Rezeptor Typ II unterteilen. Obgleich eine BMP-Bindung an den singulären BMP-Rezeptor Typ I möglich ist, bewirkt die Oligomerisierung des BMP-Rezeptor Typ II mit dem BMP-Rezeptor Typ I eine vielfach erhöhte BMP-Bindungsaffinität (Chen *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005).

Der BMP-Rezeptor Typ I wird in sieben Subtypen eingeteilt, die auch als Activin-receptor-like-Kinasen (ALK) bezeichnet werden. Dementsprechend erfolgt die Nummerierung mit den Akronymen ALK-1 bis ALK-7, wobei jeder dieser Subtypen unterschiedliche Bindungsaffinitäten für die einzelnen BMPs besitzt und damit jede BMP-Spezies unterschiedliche Präferenzen für die jeweiligen ALKs aufweist (Kirchhoff, 2014). Weiterhin lassen sich die besagten sieben Subtypen in Abhängigkeit der hauptsächlichen BMP-Bindung in drei Gruppen klassifizieren: die BMPR-I-Gruppe, die ALK-I-Gruppe und die T β R-1-Gruppe. Der BMP-Rezeptor Typ II unterteilt sich nach Kirchhoff (2014) in die Subtypen BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB, wobei eine spezifische BMP-Bindung nur für den BMPR-II-Subtyp nachgewiesen wurde. Der BMP-Rezeptor Typ II bewirkt durch Zusammenschluss mit dem BMP-Rezeptor I eine Erhöhung der BMP-Bindungsaffinität. Darüber hinaus erfährt die BMP-Bindung an die BMP-Rezeptoren über Co-Rezeptoren wie beispielsweise über die Repulsive-guidance-Molecules (RGMs) bei BMP2 oder über das Transmembranprotein Endoglin bei BMP7 eine weitere Regulierung (Xia *et al.*, 2007; Scherner *et al.*, 2007).

Wie Cao *et al.* (2005) und Miyazono *et al.* (2010) feststellten, erfolgt nach extrazellulärer Liganden-Bindung – also der Bindung eines BMPs an die extrazelluläre Domäne der BMP-Rezeptoren Typ I oder II – die Bildung eines heterotetrameren, aktivierten Rezeptorkomplexes bestehend aus zwei BMP-Rezeptoren Typ I und zwei BMP-Rezeptoren Typ II. Durch die Oligomerisation gelang eine als GS-Fragment oder GS-Box bezeichnete, charakteristische glycin- und serinreiche Domäne des BMP-Rezeptors Typ I in direkte Nachbarschaft zur cytoplasmatischen Serin-Threonin-Kinase-Domäne des Typ II-BMP-Rezeptors, welche durch die Annäherung in der Lage ist, besagtes GS-Fragment zu phosphorylieren und dadurch eine Aktivierung des BMP-Rezeptors Typ I zu bewirken. Die weitere, sich intrazellulär abspielende Signaltransduktion wird grundsätzlich über den small mothers against decapentaplegic-Signalweg, kurz Smad-Signalweg, vermittelt.

Die aktuell bekannten acht Smad-Proteine lassen sich aufgrund ihrer Funktion in drei Gruppen einteilen: die receptor-regulated-Smads (R-Smads), die common-partner-Smads (co-Smads) und die inhibiting-Smads (I-Smads). Der BMP-Rezeptor Typ I stellt dabei den einzigen Rezeptor dar, der zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von Smad-1, Smad-5 und Smad-8 in der Lage ist. Die drei besagten Signalmoleküle Smad-1, Smad-5 und Smad-8 werden der Gruppe der R-Smads zugerechnet.

Für BMP2 zeigt sich eine Signalkaskade über die Smad-Moleküle Smad-1, Smad-5 und Smad-8. So ergibt sich für BMP2 eine initiale Bindung an das Rezeptor-Tetramer aus zwei ALK-3 und zwei ALK-6, welche aufgrund ihrer Zugehörigkeit zur BMPRI-Gruppe auch synonym als BMPRI-A und BMPRI-B bezeichnet werden. Anschließend wird die intrazelluläre Signaltransduktion über die besagten Smad-1, Smad-5 und Smad-8 vermittelt. Eine andere Spezifität hinsichtlich der ALK-Bindung und der Smad-Aktivierung zeigt sich beim BMP7. Hier wird über die BMP7-Bindung an ALK-2, welche der T β R-I-Gruppe zugeordnet wird, eine intrazelluläre Signalkaskade über Aktivierung der Signalmoleküle Smad-2 und Smad-3 angestoßen.

Nach Phosphorylierung und damit verbundener Aktivierung der receptor-regulated-Smads (R-Smads) führt die Oligomerisation mit common-partner-Smads (co-Smads) zur Bildung eines R-Smad-co-Smad-Komplexes, infolgedessen es zur Translokation dieses Komplexes aus dem Cytoplasma in den Zellkern kommt. Im Nukleus fungiert der R-Smad-co-Smad-Komplex als Transkriptionsfaktor und bewirkt vielfältige Effekte im Sinne einer transkriptionalen Regulation der Genexpression. Einerseits ist die direkte Bindung an die DNA möglich, andererseits interagiert der Komplex aus R-Smad und co-Smad auch mit spezifischen DNA-bindenden Proteinen (Chen *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist auch die Rekrutierung von Co-Aktivatoren beziehungsweise Co-Repressoren der Transkription beschrieben (Massagué *et al.*, 2000). Die nachfolgend dargestellte **Tabelle 6** gibt einen Überblick über die aktuell bekannten Smad-Proteine und ihrer Struktur (modifiziert nach Moustakas *et al.*, 2009).

Smad-Protein	Gruppe	Struktur
Smad-1	R-Smad	
Smad-2	R-Smad	
Smad-3	R-Smad	
Smad-4	co-Smad	
Smad-5	R-Smad	
Smad-6	I-Smad	
Smad-7	I-Smad	
Smad-8	R-Smad	

Tabelle 6: Überblick über die Smad-Proteinfamilie (modifiziert nach Moustakas et al., 2009)

Zu den inhibierenden I-Smads zählen Smad-6 und Smad-7. Um diese Regulierung sehr exakt und fein abzustimmen, werden die R-Smads und co-Smads durch die dritte Gruppe an Smads, der inhibiting-Smads (I-Smads), gehemmt. So führt die Aktivierung der Transkription von Zielgenen gleichzeitig zur Ausbildung einer negativen Rückkopplungsschleife über die Aktivierung der I-Smads Smad-6 und Smad-7. Dabei wird über Smad-6 typischerweise eine Inhibition der BMP-Signaltransduktion ausgelöst, wohingegen Smad-7 neben der BMP-Signalkaskade auch den TGF- β - und Activin-Pathway zu hemmen vermag (Ambrock, 2013). Die Inhibition über die I-Smads erfolgt auf allen Leveln der Signalkaskade. In Untersuchungen von Miyazono *et al.* (2010) führte die Bindung der I-Smads an den BMP-Rezeptor Typ I zu einer Hemmung der Phosphorylierung von R-Smads, wodurch diese nicht mehr aktiviert werden konnten. Weiterhin führt die Interaktion

der I-Smad direkt mit den R-Smads zur Verhinderung der R-Smad-co-Smad-Komplexbildung, so dass keine Translokation des Komplexes in den Zellkern erfolgt. Zuletzt zeigen die I-Smads auch eine intranukleäre Inhibition, in dem die Smad-DNA-Komplexe gehemmt und infolgedessen die Transkription von Zielgenen verhindert wird (Miyazono *et al.*, 2010). Die nachfolgend dargestellte **Abbildung 6** zeigt schematisch den TGF- β - und BMP-Pathway mit den jeweils korrespondierenden R-Smad-, co-Smad- und I-Smad-Proteinen (aus Moustakas *et al.*, 2009).

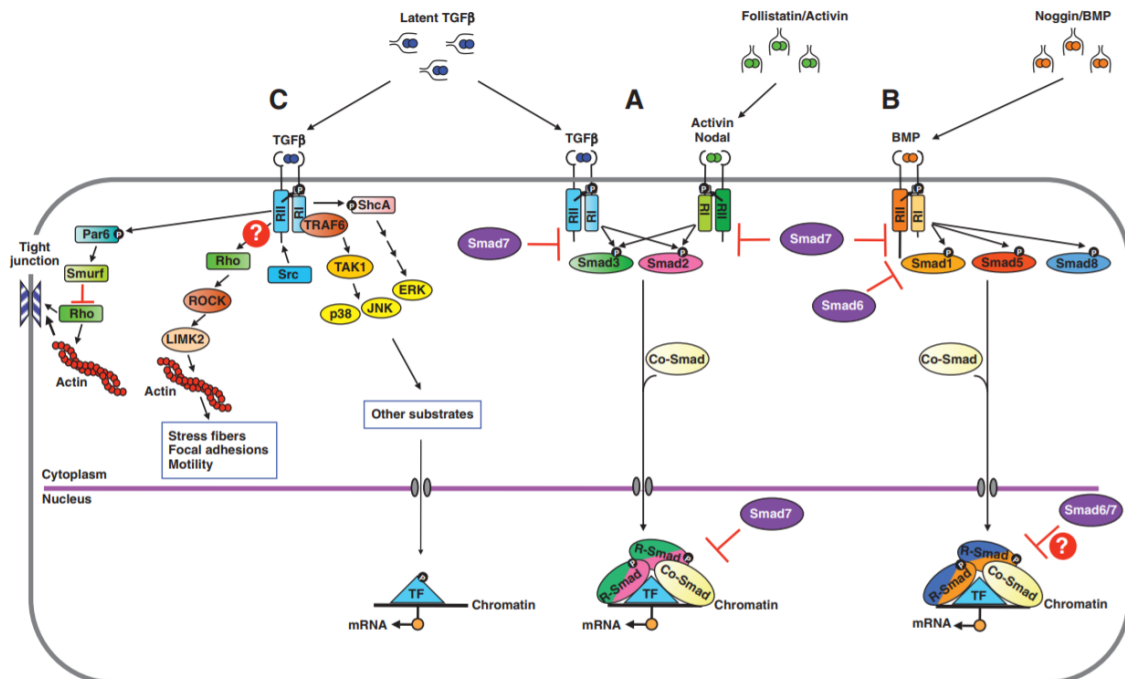


Abbildung 6: Übersicht über den TGF- β - und BMP-Pathway und die korrespondierenden Smad-Proteine (aus Moustakas *et al.*, 2009)

1.5.4 BMP7

Aufgrund der osteo- beziehungsweise chondroinduktive Potenz und der Möglichkeit der rekombinanten Herstellung wurde neben BMP2 das Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP7) zum Gegenstand intensiver Forschung. Früher wurde der Wachstumsfaktor BMP7 auch als Osteogenic Protein-1 (OP-1) bezeichnet, wobei diese Bezeichnung heute als obsolet gilt.

Das BMP7-Monomer, auch als unreife Pro-Form bezeichnet, weist eine typische Protein-Sekundärstruktur bestehend aus zwei so genannten Finger-Regionen auf, welche ihrerseits aus je vier über Disulfidbrücken gebildete β -Faltblatt-Strukturen und aus je einer α -Helix besteht (Griffith *et al.*, 1996). Dabei entsteht das aktive, funktionsfähige BMP7-Dimer durch Assoziation der α -Helix eines BMP7-Monomers mit der C-terminalen Finger-Domäne eines

anderen BMP-Monomers, wobei diese Bindung über Disulfidbrücken stabilisiert wird. Die nachfolgende **Abbildung 7** zeigt die chemische Sekundär- und Tertiärstruktur des BMP7-Monomers und des maturen BMP7-Dimers (aus Rider *et al.*, 2010 und aus Cooper *et al.*, 2012).

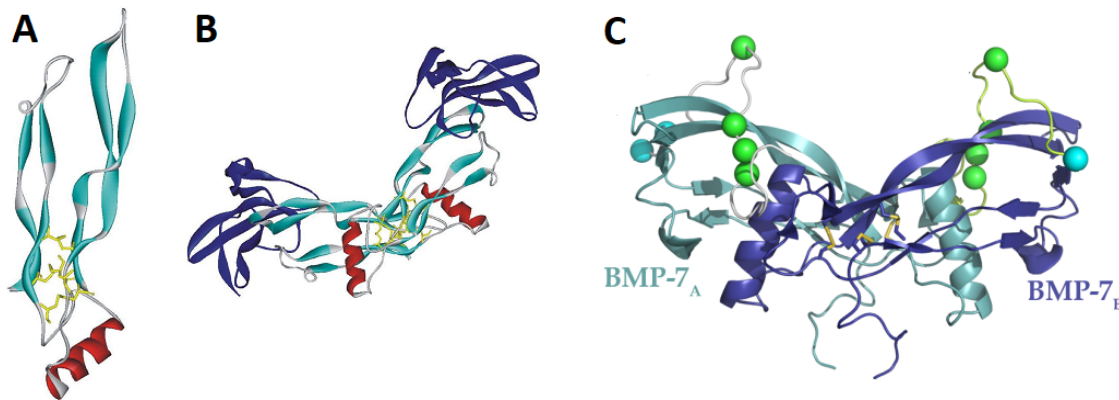


Abbildung 7: A. Sekundär- und Tertiärstruktur des BMP7-Monomers B./C. Sekundär- und Tertiärstruktur des BMP7-Dimers (aus Rider *et al.*, 2010; Cooper *et al.*, 2012).

Das reife BMP7-Dimer kann einerseits direkt an die ActR-II- und Act-RIIB-Rezeptoren binden (Macías-Silva *et al.*, 1998) und andererseits in Gegenwart von ActR-II- und ActR-IIB-Rezeptoren auch mit ActR-I-, BMPR-IA- und BMPR-IB-Rezeptoren interagieren (Yamashita *et al.*, 1995), wonach sich die im vorherigen Unterkapitel **1.5.3 BMP-Rezeptoren, BMP- und Smad-Signaltransduktion** beschriebene intrazelluläre Signaltransduktion anschließt.

In der embryonalen Skelett-Entwicklung nimmt BMP7 eine wichtige Rolle ein und ist nach Ducky *et al.* (2000) sowohl in Extremitätenknospen, in den mesenchymalen Zellen der interdigitalen Randleistensegmente als auch im hyalinen Knorpel aller Knochenanlagen nachweisbar. Im Anschluss an die embryonale Entwicklung ist BMP7 in Chondrozyten von Neugeborenen detektierbar und kann als einziger Vertreter der BMP-Subfamilie im adulten, gesunden Körper physiologischerweise nachgewiesen werden (Kirchhoff, 2014). Bei Arthrose-Entwicklung zeigt sich im Vergleich zum gesunden Knorpel eine Erhöhung der BMP7-mRNA in Chondrozyten von arthritischem Knorpel.

Dabei zeigten sich entsprechend der Arbeiten von Chubinskaya *et al.* (2000) sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Zuständen typische Verteilungsmuster der unreifen Pro-Form und der reifen Homodimer-Form. Während sich die unreifen BMP7-Monomere vornehmlich in tiefen Knorpelschichten und streng intrazellulär lokalisiert nachweisen ließen, konnten die maturen BMP7-Dimere in den mittleren und

oberflächlichen Knorpellagen sowohl intrazellulär als auch perizellulär und innerhalb der extrazellulären Matrix detektiert werden.

Zahlreiche Studien zeigten die chondroinduktive Wirkung von BMP7 und konnten nach Gelenkverletzungen und Arthritiden die Existenz von BMP7 in der Synovialflüssigkeit nachweisen. Jelic *et al.* (2001) gelang es, die knorpelreparative beziehungsweise knorpelregenerative BMP7-Wirkung in einem Schafmodell zu zeigen. In ihren Versuchen führte nach artifizierter Knorpeldefekt-Erzeugung eine anschließende zweiwöchige BMP7-Injektion zur Ausbildung eines Kollagen Typ II-haltigen, gut integriertem Reparaturgewebe innerhalb von sechs Monaten. Dahingegen blieben die beobachteten Reparaturvorgänge in der Kontrollgruppe aus.

In Chondrozyten konnte Kirchhoff (2014) anabole Effekte im Sinne der Stimulation des Metabolismus mit Synthese von knorpelspezifischen Proteinen und Matrixproteinen wie Kollagen Typ II, Aggrecan, Hyaluronsäure und Proteoglykanen nachweisen. Weiterhin zeigte die besagte Untersuchung, dass BMP7 über andere Signalwege die Stimulation der Synthese und Sekretion der Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF- β bewirkt und damit zusätzliche anabole Effekte ausübt.

Neben der anabolen Wirkung zeigt BMP7 auch eine anti-katabole Aktivität (Chubinskaya *et al.*, 2007). Beispielsweise inhibiert BMP7 die Expression der Interleukine IL-1 und IL-6, welche innerhalb von Gelenken als proinflammatorische Proteine wirken. So vermitteln diese Interleukine die Synthese von Peptidasen und Matrixmetalloproteinasen und führen dadurch zur Degradierung von Matrixproteinen und zur Knorpeldestruktion (Chubinskaya *et al.*, 2011; Nishida *et al.*, 2000).

Darüber hinaus führt BMP7 zur Induktion der Expression von IGF-1, IGF-1-Rezeptoren sowie IGF-Bindungsproteinen und hat in Kombination mit IGF-1 einen synergistischen Effekt (Kirchhoff, 2014). So beobachteten Loeser *et al.* (2003) für die Kombination beider Wachstumsfaktoren im Vergleich zur alleinigen BMP7-Wirkung eine mehr als doppelt erhöhte Proliferationsrate von Chondrozyten und eine Verdopplung der Synthese von extrazellulärer Membran. Auch Im *et al.* (2003) zeigten einen synergistischen Mechanismus von IGF-1 und BMP7, indem sie eine signifikant gesteigerte Inhibition von Matrixmetalloproteinasen nachwiesen.

Neben den Effekten auf die Expression unterschiedlicher Proteine und Wachstumsfaktoren konnten auch Einflüsse von BMP7 auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen nachgewiesen werden. Unter BMP7-Stimulation zeigten Untersuchungen von Shen *et al.* (2010) und Lavery *et al.* (2009) die Differenzierung von humanen Knochenmark-Stammzellen zu funktionsfähigen, reifen Osteoblasten und Chondrozyten.

1.6 Vorarbeiten, Zielsetzung und Versuchsaufbau

Zahlreiche Studien belegen die BMP7-vermittelte positive Wirkung auf Knochen- und Sehnenzellen. Hinsichtlich der komplexen Knochen-Sehnen-Interaktion konnten bereits Mihelic *et al.* (2004) in einem Schafmodell den proliferativen Einfluss von BMP7 nach VKB-Rekonstruktionen nachweisen.

1.6.1 Vorherige Vorarbeiten und Untersuchungen

Da die ossäre Sehnenintegration in der Orthopädie und Unfallchirurgie eine häufige klinische Herausforderung darstellt, welche jedoch teilweise mit sehr hohen Raten für ein Transplantatversagen (siehe Unterkapitel **1.4.5 Komplikationen nach operativer VKB-Versorgung**) einhergeht, ist die Untersuchung der Hintergründe und die Verbesserung der Therapieverfahren ein nach wie vor aktuelles unfallchirurgisch-orthopädisches Forschungsthema. Auch in der Arbeitsgruppe Sporttraumatologie und arthroskopische Chirurgie des Zentrums für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikum Marburgs stellt das Thema der Knochen-Sehnen-Einheilung und der Transplantat-Inkorporation einen wichtigen Forschungsschwerpunkt dar, wobei schwerpunktmäßig neben dem Einfluss selektiver Cyclooxygenase 2-Hemmer (COX-2) der Effekt des Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) und des Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7) untersucht wurde beziehungsweise auch in Zukunft untersucht wird.

Initial erfolgte im Rahmen zweier Dissertationen (Crönlein, 2012; Ambrock, 2013) die Analyse des Einflusses von BMP2 und BMP7 auf primäre bovine Osteoblasten und Fibroblasten.

In einem *in vitro*-Zellkultur-Modell auf Basis einer bovinen Knochen-Stammzellkultur untersuchte Crönlein (2012) bovine Sehnen unter BMP2-Stimulation über einen dreimonatigen Kultivierungs-Zeitraum und studierte den Kalzifizierungsgrad sowohl mikroskopisch beziehungsweise histologisch als auch biochemisch. In dieser Studie zeigten sich Hinweise auf einen triggernden BMP2-Effekt auf die Mineralisierungsprozesse der Sehnen, so dass BMP2 die Abläufe der Knochen-Sehnen-Integration zu beschleunigen vermag. Insgesamt ließen sich in dieser Arbeit die in der Literatur beschriebenen Einflüsse von BMP2 auf Osteoblasten bestätigen, jedoch zeigte sich auch eine direkte Wirkung auf Fibroblasten, so dass eine BMP2-bedingte Ossifikation, die sowohl von Osteoblasten als auch von Fibroblasten ausgeht, postuliert wurde.

In der Arbeit von Ambrock (2013) erfolgte die Untersuchung des BMP7-Einflusses im analogen Versuchsaufbau über eine Laufzeit von zehn Wochen mit nachfolgender Analyse der alkalischen Phosphatase, der Laktatdehydrogenase und des Laktats aus dem Zelllysat

und aus dem Medienüberstand. In dieser Studie konnten sowohl positive BMP7-Effekte auf Osteoblasten als auch auf Fibroblasten gezeigt werden, so dass ein enges Zusammenspiel von Osteoblasten und Fibroblasten im Rahmen der ossären Sehnen-Integration vermutet wurde, welches insbesondere durch BMP7-Stimulation beschleunigt respektive verbessert werden könne.

Da in den beiden zuvor genannten Dissertationsarbeiten, aus denen die Publikationen von Struwer *et al.* (2013) und Schwarting *et al.* (2015) hervorgingen, die genauen Mechanismen der BMP2- respektive BMP7-Wirkung auf Osteoblasten und Fibroblasten weiterhin unzureichend geklärt verblieb und darüber hinaus die Studien von Ambrock (2013) auch einen inhibitorischen Effekt der Fibroblasten auf die Osteoblasten-Proliferation und den Osteoblasten-Metabolismus zeigte, bedurfte es weiterer Studien zur Beurteilung der komplexen biologischen Prozesse der Knochen-Sehnen-Integration und zur Evaluierung des Potentials einer BMP7-Behandlung.

Um die zugrundeliegenden molekularen und biochemischen Prozesse der BMP-Signaltransduktion sowie der Zell-Zell- und der Zell-Matrix-Interaktion besser charakterisieren zu können, wurde in der oben genannten Arbeitsgruppe aufgrund der limitierten Verfügbarkeit primärer osteoblastischer und fibroblastischer Zellen ein Modell zur Co-Kultivierung sekundärer muriner Osteoblasten- und Fibroblasten-Zelllinien etabliert. Hier diente die Arbeit von Wang *et al.* (2007), in der primäre osteoblastische und fibroblastische Zellen in einem *in vitro*-Co-Kultur-Modell mittels Fluoreszenz-Markierung, Mikroskopie und Genexpressions-Analyse untersucht wurden, als methodische Grundlage. So wurde ein modifiziertes Co-Kultur-Modell basierend auf Wang *et al.* (2007) zur Analyse der Plastizität von Osteoblasten beziehungsweise Fibroblasten und zur Erforschung der engen zellbiologischen Interaktion zwischen Knochen- und Sehnengewebe eingesetzt. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen zu einem detaillierteren Verständnis pathophysiologisch-relevanter Mechanismen im Rahmen der Knochen-Sehnen-Integration beitragen.

1.6.2 Fragestellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Promotionsarbeit sollen die durch die Vorversuche publizierten osteoinduktiven und proliferativen Eigenschaften von BMP7 auf das Einheilungsverhalten von Sehnen und dessen ossäre Integration bestätigt und mittels molekularbiologischer Untersuchungen weiterführend charakterisiert werden. Eine analoge, parallele Untersuchung der Effekte von BMP2 wurde von Schenk (noch nicht eingereicht) durchgeführt.

Die Arbeitshypothese dieser Studie besagt, dass die BMP7-Applikation im Co-Kultur-Modell aus murinen Osteoblasten und Fibroblasten einerseits zur beschleunigten Zell-Proliferation der osteoblastischen Zellen und zur erhöhten Ausbildung von Proteinen der extrazellulären Membran führt und andererseits die Formierung von osteogenen Eigenschaften in den fibroblastischen Zellen (aufgrund ihrer hohen Plastizität) bewirkt. Damit sollen die geplanten Untersuchungen die nachfolgenden Fragestellungen beantworten:

- Welche Plastizität findet im Rahmen der ossären Sehnen-Integration statt? Ist diese gekennzeichnet durch das Einwachsen von Osteoblasten in das Sehnengewebe? Oder handelt es sich umgekehrt um das Auswachsen von Fibroblasten aus dem Sehnengewebe in das Knochengewebe mit möglicherweise gleichzeitiger osteogener Transdifferenzierung der fibroblastischen Zellen?
- Welchen Einfluss hat BMP7 auf die Prozesse der Knochen-Sehnen-Integration? Beschleunigt BMP7 sowohl die Osteoblasten- als auch Fibroblasten-Entwicklung oder resultieren auch hemmende Effekte?
- Welche molekularen Signaltransduktionen liegen der BMP7-Wirkung zugrunde und welche weiteren Proteine sind beteiligt?
- Passen die Ergebnisse der Genexpressions-Analyse zu den histologischen Veränderungen?

1.6.3 Studien-Aufbau und konzeptionelle Versuchsplanung

Zur Beantwortung der im vorherigen Unterkapitel beschriebenen Fragestellungen sollte als methodische Grundlage ein neu etabliertes, auf den Arbeiten von Wang *et al.* (2007) beruhendes Co-Kultur-Modell aus sekundären murinen Osteoblasten und Fibroblasten dienen. Dabei wurden am Co-Kultivierungs-Ansatz von Wang *et al.* (2007) einige Modifikationen vorgenommen, um ein High-Throughput-Verfahren mit höchstmöglicher Durchsatzrate (Wilke *et al.*, 2003) zu konstruieren und zu etablieren.

Da die Gewinnung primärer Zellen meist einen limitierenden Faktor darstellt, wurden in der vorliegenden Arbeit sekundäre, murine Zelllinien verwendet. Nach Sichtung der aktuell zu Forschungszwecken verwendeten Zelllinien fiel die Entscheidung einerseits auf die adhärente, prä-osteoblastische Zelllinie MC3T3-E1 und andererseits auf die adhärente, fibroblastische Zelllinie 3T3.

Die MC3T3-E1-Zelllinie stellt eine sekundäre, murine Zelllinie mit der Möglichkeit zur osteogenen Differenzierung dar. Sie findet in zahlreichen Bereichen der knochen-biologischen Forschung als Modellsystem Verwendung und wurde auch von Wang *et al.*

(2007) eingesetzt. Da diese Zellen über ein enormes osteogenes Potenzial verfügen, ein kontakt-inhibierendes Monolayer-Wachstum aufweisen und in einer Dauerkultur haltbar sind, fiel zur Untersuchung der Osteoblasten-Tätigkeit im Rahmen der Versuchsdurchführungen in dieser Arbeit die Auswahl auf besagte MC3T3-E1-Zelllinie.

Die in Wang *et al.* (2007) verwendeten 3T6-Fibroblasten-Zellen zeigten in Arbeitsgruppen-internen, hier nicht weiter beschriebenen Versuchen keine Kontakt-Inhibition und deadhätierten beim Erreichen eines konfluenten Stadiums, womit sich diese Zelllinie als unzulänglich für den Einsatz in dieser Arbeit erwies. Bei der Suche nach einer geeigneten fibroblastischen Zelllinie fiel die Entscheidung zugunsten der sekundären Zelllinie 3T3, da diese einerseits standardmäßig zur Untersuchung von Fibroblasten verwendet wird und sich andererseits durch Eigenschaften wie das adhärente, kontakt-inhibierende Wachstum im Monolayer, die fibroblasten-ähnlicher Morphologie und der Möglichkeit zur kontinuierlichen Kultivierung auszeichnet. Im Gegensatz zur in Wang *et al.* (2007) verwendeten 3T6-Fibroblasten-Zelllinie, ergaben nicht weiter beschriebene, interne Voruntersuchungen das gewünschte, kontakt-inhibierende Verhalten der 3T3-Zellen (siehe auch das Unterkapitel **2.1.3 Zelllinien**).

Um ausreichende Mengen an osteoblastischen und fibroblastischen Zellen zu generieren, wurden die zuvor genannten beiden Zelllinien bis zur 6. – 9. Passage bei einem Konfluenzniveau von 70-80% subkultiviert. Da im Rahmen der Co-Kultivierungs-Untersuchungen ein gemeinsames Kultivierungsmedium Verwendung fand, wurden die osteoblastischen Zellen zum Zwecke der Umgewöhnung zehn Tage vor Beginn der Co-Kultivierung auf das Kultivierungsmedium der fibroblastischen Zellen umgestellt. In hier nicht näher dargestellten, arbeitsgruppen-internen Resultaten ergab die Umgewöhnung der Osteoblasten an das Kulturmedium der Fibroblasten zwar eine leichte Proliferationsraten-Reduktion, jedoch zeigte sich keine Beeinflussung sowohl bezüglich der zellulären Differenzierung der Osteoblasten als auch hinsichtlich der Expression osteogener Markergene.

Ein an Wang *et al.* (2007) angelehntes Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-System wurde etabliert, wobei die beiden Kompartimente der Gewebekulturschale (Durchmesser 100 mm, Radius 50 mm) von einer 12 mm breiten Trennschicht aus 4%-iger, zellkultur-getesteter Agarose, nachfolgend auch als Divider bezeichnet, separiert wurden. Da diese Trennschicht nur der temporären Nutzung zum Zwecke der initialen Kultivierung dienen sollte und nach zwei Tagen der Co-Kultivierungsversuche wieder entfernt wurde, existieren insgesamt drei zu unterscheidende Bereiche: der Wachstumsbereich der osteoblastischen

Zellen, der nach Divider-Entfernung freigegebene Trennbereich und der fibroblastischen Wachstumsbereich. Mathematisch approximiert ergeben sich die in den nachfolgenden Berechnungen dargelegten Flächen von jeweils 33,27 cm² sowohl für die osteoblastischen Zellen als auch die fibroblastischen Zellen ($A(\text{Osteoblasten}) = A(\text{Fibroblasten})$) und eine Fläche von 12 cm² für den nach Divider-Entfernung freigegebenen Trennbereich ($A(\text{Divider})$).

$$A(\text{Gewebekulturschale}) = \pi \times r^2 = \pi \times (50 \text{ mm})^2 \approx 7853,982 \text{ mm}^2 \approx 7854 \text{ mm}^2 \\ = 78,54 \text{ cm}^2$$

$$A(\text{Divider}) = \text{Breite} \times \text{Länge} = 12 \text{ mm} \times 100 \text{ mm} = 1200 \text{ mm}^2 \\ = 12 \text{ cm}^2$$

$$A(\text{Osteoblasten}) = (A(\text{Gewebekulturschale}) - A(\text{Divider})) \div 2 = (78,54 \text{ cm}^2 - 12 \text{ cm}^2) \div 2 \\ = 33,27 \text{ cm}^2$$

$$A(\text{Fibroblasten}) = A(\text{Osteoblasten}) \\ = 33,27 \text{ cm}^2$$

Da die zuvor genannten Wachstumsflächen größer waren als die Modell-Flächen in der Arbeit von Wang *et al.* (2007), wurden bei der Zellaussaat mit 1×10^6 Zellen – statt 5×10^4 Zellen wie bei Wang *et al.* (2007) – deutlich mehr osteoblastische und fibroblastische Zellen in die vorgesehenen Wachstumsbereiche ausgesät. Analog zu Wang *et al.* (2007) wurde ein Differenzierungsmedium basierend auf DMEM, an welches sowohl die Osteoblasten als auch die Fibroblasten gewöhnt waren, unter Zusatz von Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat zur Induktion der Zelldifferenzierung eingesetzt. Im Gegensatz zu Wang *et al.* (2007) erfolgte jedoch nur eine zweitägige statt einer einwöchigen Co-Kultivierung der Zellen bis zur Entfernung des Dividers.

Während Wang *et al.* (2007) die „natürlichen“ Veränderungen der Osteoblasten und Fibroblasten im Co-Kultur-Modell untersuchten, erfolgte in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen die Stimulation der beteiligten Zellen mit dem Wachstumsfaktor BMP7, wonach die ausgelösten Effekte im Vergleich zu nicht-stimulierten Kontrollgruppen analysiert wurden. Um die Co-Kultivierungs-Versuche möglichst anwendungsnah durchzuführen wurde kein laborgerechtes, molekular-aufgereinigtes BMP7 eingesetzt, sondern ein im medizinischen Bereich verwendetes BMP7-Präparat genutzt. Hier fiel die Wahl auf das rekombinante humane, für bestimmte klinische Einsatzgebiete zugelassene Osigraft eptoterminal alfa (Firma Stryker GmbH & Co. KG (Duisburg, Deutschland), siehe auch Unterkapitel **1.5.2 BMP-Subfamilie**). Nachfolgend wird dieses auch als rhBMP7 abgekürzt.

In Wang *et al.* (2007) erfolgte zur Differenzierung von Osteoblasten und Fibroblasten vor der Aussaat der Zellen in die Co-Kultivierungs-Gewebescheiden eine Zell-Markierung mittels Fluoreszenzmarkern, genauer gesagt eine Kennzeichnung der Osteoblasten mit dem Vybrant CFDA Cell-Labeling-Kit (Molecular Probes, Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)) und der Fibroblasten mit dem Vybrant CM-DiI Cell-Labeling-Kit (Molecular Probes, Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)). Initial war für diese Arbeit ebenfalls die Fluoreszenzmarker-vermittelte Kennzeichnung der unterschiedlichen Zelllinien geplant, wobei im Anschluss an die Co-Kultivierung und die Zell-Ernte die osteoblastischen und fibroblastischen Zellen über eine Durchfluss-Zytometrie und eine Zell-Sortierung mittels MoFlo High-Speed Cell-Sorter der Firma Beckman Coulter Life Science (Krefeld, Deutschland) separiert werden sollten. In hier nicht näher dargestellten, arbeitsgruppen-internen Resultaten ergaben sich jedoch einerseits Hinweise auf toxische und de-adhärierende Effekte der Fluoreszenzmarker auf die verwendeten MC3T3-E1- und 3T3-Zellen und andererseits zeigten sich Nachweise von Duplett- und Triplett-Bildungen in der Zell-Sortierung, was nicht zuletzt in einer stark reduzierten, für die anschließenden Versuchsdurchführungen nicht ausreichenden Zellausbeute resultierte. Aufgrund dieser Limitationen wurde das ursprüngliche Co-Kultivierungs-Modell aus Wang *et al.* (2007) in unterschiedlicher Art und Weise modifiziert und auf die notwendigen experimentellen Anforderungen hin angepasst. So wurde keine fluoreszente Markierung der MC3T3-E1-Zellen und der 3T3-Zellen durchgeführt, sondern es erfolgte nach Durchführung der Co-Kultivierungs-Versuche die visuelle, manuelle Extraktion und Separation der beteiligten Zellen mittels Zellschabern, wonach sich jeweils eine Zell-Ernte aus dem Osteoblasten-, dem Fibroblasten- und dem Interface-Bereich ergaben.

Nach Extraktion beziehungsweise Isolation des Transkriptoms erfolgte die Purifikation der genomischen RNA und anschließend die photometrische Quantifikation. Im weiteren Verlauf der dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurde die cDNA-Bibliothek-Erstellung unter Verwendung einer reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Analyse relevanter Markergene der Osteogenese mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) und unter Bezugnahme auf vordefinierten Referenzgene.

Bei Referenzgenen handelt es sich im Optimalfall um sogenannte Haushalts-beziehungsweise Housekeeping-Gene, welche idealerweise konstitutiv exprimiert und nicht reguliert werden. Solche Gene sind somit sowohl von intrinsischen Faktoren wie dem Zell- und dem Proliferations-Stadium als auch von extrinsischen, äußerlichen Einflüssen unabhängig, weisen konstante Expressionsverhalten auf und unterliegen keiner Regulation.

Die häufig verwendeten, auch in Wang *et al.* (2007) eingesetzten 18S-rRNA und GAPD-Referenzgene zeigten gemäß einer aktuellen Literatursichtung sowohl in den verwendeten osteoblastischen Zellen als auch in den fibroblastischen Zellen eine Hochregulation mit fortschreitender Differenzierung und stellten daher keine optimalen Referenzgene zur qRT-PCR-Analyse dar. Daher erfolgte, wie in Stephens *et al.* (2011) und Arsenijevic *et al.* (2012) empfohlen, die Verwendung des β -Aktin-Gens (Actb) und des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1-Gens (Hprt1) als Referenzgene, wobei die Primer-Sequenzen aus den zuvor genannten Publikationen entnommen wurden (siehe diesbezüglich auch das Unterkapitel **2.1.5 Oligonukleotide**).

Zur Analyse der Veränderungen des Osteoblasten- und des Fibroblasten-Verhaltens im Rahmen der Co-Kultivierung im Zwei-Kammer-Modell und unter singulärer respektive multipler rhBMP7-Zugabe sind molekulare Marker notwendig, deren Expressionsmuster sich zeitlich gemäß der osteogenen beziehungsweise fibrogenen Differenzierung darstellen und somit Rückschlüsse auf die chronologische Entwicklung der beteiligten Zelllinien erlauben. In der Literatur zeigten sich nach Cohen (2006) und Khurana (2016) vor allem die Gene für den Runt-ähnlicher Transkriptionsfaktor-2 (Runx2), für die Alpha 1-Kette des Kollagen Typ 1 (Col1a1), für die knochenspezifische alkalische Phosphatase 1 (Alp1) sowie für das sezerniertes Phosphoprotein (Spp1, auch als Osteopontin (Opn) bezeichnet) und das knochenspezifische γ -Carboxylglutamat-Protein (Bglap, auch als Osteocalcin (Ocn) bezeichnet) als Zielgene geeignet.

Nach Cohen (2006) ergibt sich in der Abfolge der osteogenen Differenzierung initial eine erhöhte Runx2-Expression, die in Prä-Osteoblasten eine osteoblastische Entwicklung induziert und eine gesteigerte Col1a1-Expression hervorruft. Unter dem Einfluss von Osterix kommt es zur weiteren Differenzierung zum funktionalen Osteoblasten, welcher neben einer noch weiter erhöhten Col1a1-Expression eine gesteigerte Expression von Osteocalcin (Ocn, Bglap), Osteonectin, Osteopontin (Opn, Spp1) und alkalischer Phosphatase (Alp1) aufweist. Die nachfolgend gezeigte **Abbildung 8** zeigt den Ablauf der Osteoblasten-Differenzierung modifiziert nach Cohen (2006).

Untersuchungen von Luu *et al.* (2007) und Weinreb *et al.* (1990) ergaben, dass sich bezüglich des zeitlichen Auftretens der zuvor genannten Zielgene zuerst eine gesteigerte Genexpression der alkalischen Phosphatase, danach eine erhöhte Genexpression von Osteopontin (Spp1) und zuletzt ein Genexpressionsanstieg von Osteocalcin (Bglap) zeigt. Die nachfolgend dargestellte **Abbildung 9** aus Luu *et al.* (2007) zeigt den chronologischen Verlauf der Markergen-Expressionsmuster.

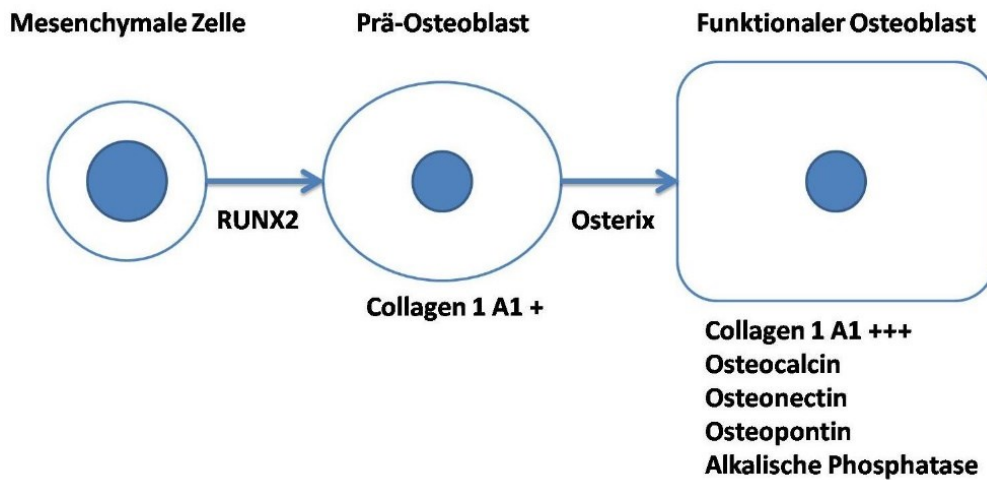


Abbildung 8: Osteogene Differenzierung und Marker- beziehungsweise Zielgene (modifiziert nach Cohen, 2006)

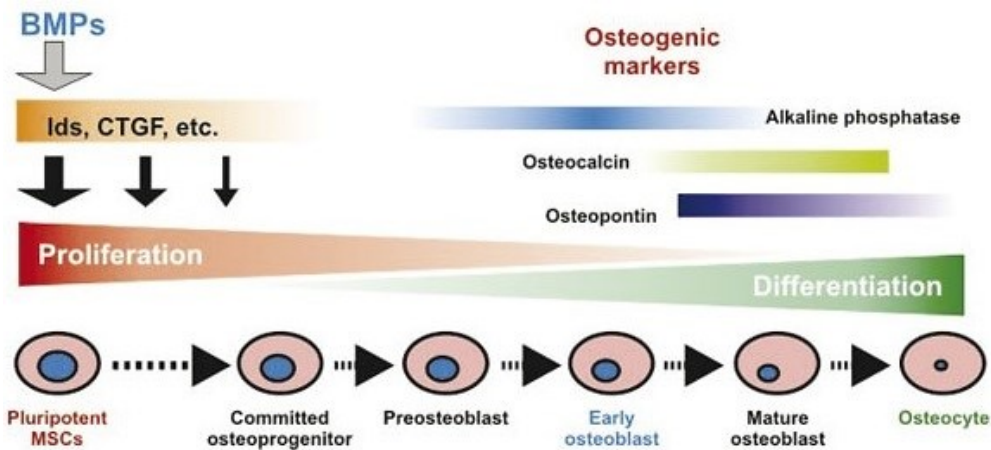


Abbildung 9: Osteogene Differenzierung und Marker- beziehungsweise Zielgene (modifiziert nach Luu et al., 2007)

Khurana (2016) wies in seinen Arbeiten eine kontinuierliche Erhöhung der Runx2-Expression in Rahmen der osteogenen Differenzierung nach. Mit etwas zeitlicher Verspätung und vermutlich beruhend auf den Runx2-vermittelten Effekten resultiert ein Anstieg der Col1a1- und der Alp1-Expression. Während die Alp1-Expression eine sukzessive, lineare Zunahme während der Differenzierung zu reifen Osteoblasten aufweist, zeigten Weinreb *et al.* (1990) und Khurana (2016) für die Col1a1-Expression initial eine Steigerung bis zum Maximalwert im Prä-Osteoblasten-Stadium, wobei es nachfolgend zu einer kontinuierlichen Reduktion der Expression kommt. Ab dem Differenzierungsgrad der reifen Osteoprogenitorzellen lassen sich zunehmende Expressionslevel für Osteopontin (OPN, Spp1) und von Osteocalcin (OCN, Bglap) beobachten. Die **Abbildung 10** stellt die Ergebnisse aus Weinreb *et al.* (1990) und Khurana (2016) und das chronologische Auftreten der Expressionsmuster zuvor genannter Markergene graphisch dar.

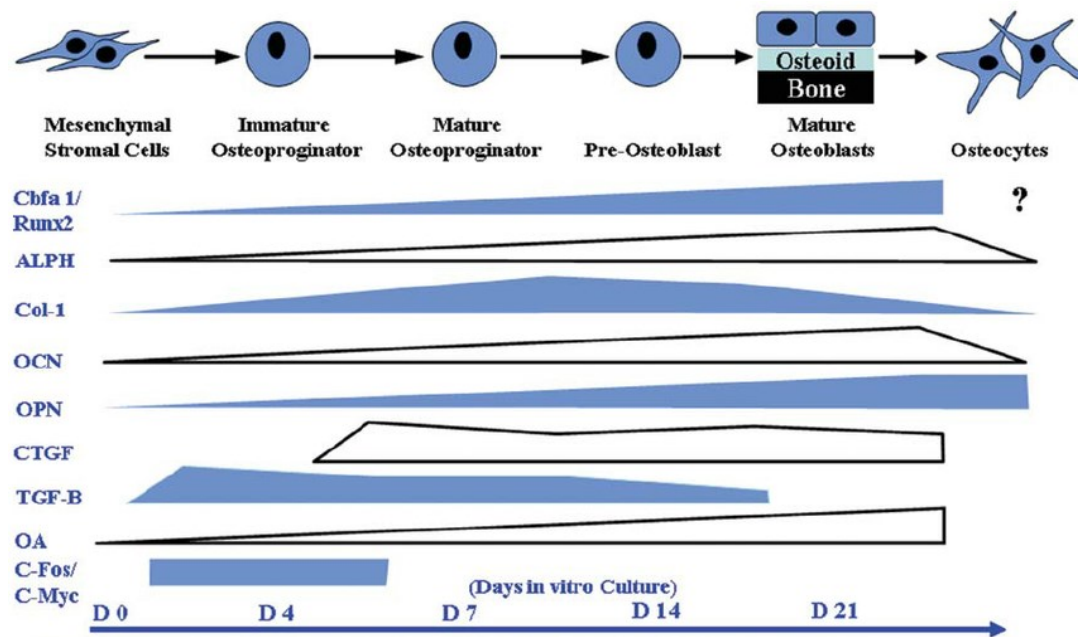


Abbildung 10: Zeitabhängiges Auftreten unterschiedlicher Expressionsmarker im Rahmen der Osteoblasten-Differenzierung (aus Khurana, 2016)

Beruhend auf dem zuvor genannten, zeitlichen Auftreten der Zielgene wurden einerseits die Versuchsdurchführungen geplant und andererseits die Strukturierung der Ergebnisse und der Diskussion in dieser Arbeit ausgelegt. Es ergibt sich somit in Abhängigkeit der Chronologie der unterschiedlichen Expressionsmarker die nachfolgende Reihenfolge:

- Runx2: Marker der initialen osteogenen Differenzierung (Transkriptionsfaktor und Induktor der Osteoblasten-Differenzierung)
- Col1a1: Marker der frühen osteogenen Differenzierung
- Alp1: Marker der frühen bis mittleren osteogenen Differenzierung
- Spp1: Marker der mittleren bis späten osteogenen Differenzierung
- Bglap: Marker der späten bis finalen osteogenen Differenzierung

In der experimentellen Konzeption wurde jeweils ein Versuchsdurchlauf mit einmaliger rhBMP7-Stimulation und ein Versuchsdurchlauf mit mehrmaliger Applikation von rhBMP7 geplant. Im singulären Stimations-Versuch wurde direkt nach Divider-Entfernung die einmalige rhBMP7-Applikation in Dosierungen von 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml durchgeführt und die Veränderungen nach 3 Tagen, 7 Tagen und 10 Tagen untersucht. An den zuvor genannten Untersuchungs-Tagen erfolgte bei den noch nicht zur Zell-Ernte vorgesehenen Kulturgewebescheiden ein geplanter Wechsel des Differenzierungsmediums. Im multiplen Versuchsansatz erfolgte die mehrfache Anwendung von rhBMP7. Daher fand einerseits die rhBMP7-Applikation direkt nach Divider-Entfernung statt und andererseits erfolgte nach 3 Tagen und 7 Tagen im Rahmen des geplanten Wechsels des

Differenzierungsmediums ebenfalls die erneute rhBMP7-Zugabe. Dabei wurden analog zur singulären Versuchsdurchführung die Konzentrationen von 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml rhBMP7 hinzugegeben. Nach 3 Tagen, 7 Tagen und 10 Tagen erfolgten die Zell-Ernten, wobei bei den noch nicht für die Zell-Ernte vorgesehenen Zellen einerseits der Austausch des Differenzierungsmediums und andererseits wie zuvor bereits erwähnt eine erneute rhBMP7-Applikation in den bereits erwähnten Konzentrationen erfolgte. Die nachfolgende **Tabelle 7** fasst die unterschiedlichen Applikations-Kombinationen von rhBMP7 im Rahmen dieser Arbeit zusammen.

Anzahl an rhBMP7-Stimulationen	Ernte- / Analyse-Zeitpunkt	Verwendete rhBMP7-Konzentration
Singuläre Stimulation	3 Tage	100 ng/ml
		250 ng/ml
		500 ng/ml
	7 Tage	100 ng/ml
		250 ng/ml
		500 ng/ml
	10 Tage	100 ng/ml
		250 ng/ml
		500 ng/ml
Multiple Stimulation	3 Tage	100 ng/ml
		250 ng/ml
		500 ng/ml
	7 Tage	100 ng/ml
		250 ng/ml
		500 ng/ml
	10 Tage	100 ng/ml
		250 ng/ml
		500 ng/ml

Tabelle 7: Dieser Arbeit zugrundeliegende Stimulations-Ansätze, Untersuchungs-Zeitpunkte und rhBMP7-Konzentrationen

Alle Kombinationen aus Stimulations-Modus (singulär versus multiple), Zell-Ernte-Zeitpunkt (3 Tage, 7 Tage, 10 Tage) und rhBMP7-Konzentration (100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml) wurden zur besseren statistischen Auswertung in drei parallelen Co-Kultivierungs-Schalen durchgeführt und dementsprechend in Form von drei biologischen Replikaten realisiert. Damit ergeben sich die in der nachfolgenden **Tabelle 8** dargestellte Anzahl an Co-Kultivierungs-Gewebekulturschalen, wobei im Anhang unter **10.1.1 ID-Liste für die Zwei-Kammer-Co-Kultivierung** die genauen Auflistungen aller eingesetzten Gewebekulturschalen samt Identifikationsbezeichnung aufgeführt sind.

Anzahl	Anmerkung
3	Zeitpunkt „0 Tage“ (1 Konzentration (0 ng/ml), 3 biologische Replikate)
12	Zeitpunkt „3 Tage“ (4 Konzentrationen (0/100/250/500 ng/ml, je 3 biologische Replikate)
12	Zeitpunkt „7 Tage“ (4 Konzentrationen (0/100/250/500 ng/ml, je 3 biologische Replikate)
12	Zeitpunkt „10 Tage“ (4 Konzentrationen (0/100/250/500 ng/ml, je 3 biologische Replikate)
= 39	39 Gewebekulturschalen für singulären oder multiplen rhBMP7-Stimulations-Versuch
= 78	78 Gewebekulturschalen für beide rhBMP7-Stimulations-Versuche

Tabelle 8: Anzahl der verwendeten Co-Kultivierungs-Gewebekulturschalen

Parallel zur Durchführung der Co-Kultivierung und der rhBMP7-Applikation erfolgte die Zell-Ernte für die Proben der Stichprobe „0 Tage“, wobei sich diesbezüglich pro Ansatz ein Osteoblasten- und ein Fibroblasten-Zelllysate ergab. Für die anderen festgelegten Zeitpunkte resultierten jeweils drei unterschiedliche Ernte-Bereiche, genauer gesagt die Zell-Ernte aus dem Osteoblasten-Bereich, die Zell-Ernte aus dem Interface-Bereich und die Zell-Ernte aus dem Fibroblasten-Bereich. Da für jede dieser Zell-Fraktionen eine RNA-Isolierung durchgeführt wurde, ergab sich die in der nachfolgenden **Tabelle 9** dargestellte Berechnung der Anzahl der verwendeten RNA-Proben.

Anzahl	Anmerkung
6	Zeitpunkt „0 Tage“ (1 Konzentration (0 ng/ml), 3 biologische Replikate, je 2 Bereiche (Osteoblasten, Fibroblasten; kein Interface-Bereich vorhanden))
36	Zeitpunkt „3 Tage“ (4 Konzentrationen (0/100/250/500 ng/ml, je 3 biologische Replikate, je 3 Bereiche (Osteoblasten, Fibroblasten, Interface))
36	Zeitpunkt „7 Tage“ (4 Konzentrationen (0/100/250/500 ng/ml, je 3 biologische Replikate, je 3 Bereiche (Osteoblasten, Fibroblasten, Interface))
36	Zeitpunkt „10 Tage“ (4 Konzentrationen (0/100/250/500 ng/ml, je 3 biologische Replikate, je 3 Bereiche (Osteoblasten, Fibroblasten, Interface))
= 114	114 RNA-Proben für singulären oder multiplen rhBMP7-Stimulations-Versuch
= 228	228 RNA-Proben für beide rhBMP7-Stimulations-Versuche

Tabelle 9: Anzahl der verwendeten RNA-Proben

Im Anhang unter **10.1.2 ID-Liste für die RNA- beziehungsweise cDNA-Proben** sind die einzelnen RNA- und cDNA-Proben samt Identifikationskennung aufgelistet. Im Anschluss an die RNA-Isolierung und -Aufreinigung erfolgte nach photometrische Quantifizierung die RT-PCR zwecks Erstellung von cDNA-Bibliotheken, wobei die detaillierten Ergebnisse im Anhang unter **10.1.5 Ergebnisse der photometrischen RNA-Konzentrations-Bestimmung** und **10.1.6 Ergebnisse der Generierung von cDNA aus genomischer RNA** abgebildet sind. Um im Anschluss gezielt die Expressionen unterschiedlicher Gene

untersuchen zu können, erfolgte eine Aliquotierung der cDNA, also eine Verdünnung eines Teilvolumens der cDNA-Ansätze. Im Anhang unter **10.1.7 Ergebnisse der Verdünnung der cDNA** sind die Ergebnisse diesbezüglich ausführlich dargestellt.

Wie bereits zuvor erwähnt, erfolgte die qRT-PCR-Analyse der Expression der Zielgene Runx2, Col1a1, Alp1, Spp1 und Bglap unter Normalisierung auf die Expressionslevel der beiden Referenzgene Actb und Hprt. Dabei wurde aufgrund der besseren statistischen Genauigkeit jeder qRT-PCR-Ansatz als Triplet, also in Form dreier technischer Replikate, durchgeführt. Die nachfolgend aufgeführte **Tabelle 10** gibt die Anzahl an benötigten qRT-PCR-Reaktionen an.

Anzahl	Berechnung der benötigten Anzahl an qRT-PCR-Ansätzen
= 2394	114 RNA-Proben insgesamt, 7 Gene (5 Zielgene und 2 Referenzgene), jeweils 3 technische Replikate

Tabelle 10: Anzahl der verwendeten qRT-PCR-Ansätzen

Zusätzlich zu den zuvor genannten 2394 qRT-PCR-Ansätzen wurden pro 96er PCR-Platte zwei Negativ-Kontrollen (qRT-PCR-Ansätze ohne cDNA) sowie eine fünfstufige Standard-Reihe durchgeführt. Im Anhang findet sich im Unterkapitel **10.1.3 ID-Liste für die Standardreihen der qRT-PCRs** die Nummerierung und die Zusammensetzung der unterschiedlichen, verwendeten Standard-Reihen.

Weiterhin enthält der Anhang im Unterkapitel **10.1.8 Ergebnisse des PCR-Platten-Designs für die qRT-PCR-Durchführung** die Schemata aller durchgeführten qRT-PCR-Analyse. Desweiteren sind im Anhang im Subkapitel **10.1.9 Ergebnisse der qRT-PCRs-Effizienzanalyse** die jeweiligen Effizienzen für die in qRT-PCR-Durchläufe eingesetzten Referenzgenen und Markergen aufgeführt.

1.6.4 Veröffentlichte Publikationen

Aus dieser und der parallelen (Schenk, noch nicht eingereicht) Dissertationsarbeit sind die nachfolgenden Publikationen entstanden:

- Schwarting, T., Benölken, M., Ruchholtz, S., Frink, M., Lechler, P. (2015). *Bone morphogenetic protein-7 enhances bone-tendon integration in a murine in vitro co-culture model*. International orthopaedics, Band 39, Auflage 4, Seite 799-805. (Schwarting, 2015)

- Schwarting, T., Schenk, D., Frink, M., Benölken, M., Steindor, F., Oswald, M., Ruchholtz, S., Lechler, P. (2016). *Stimulation with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) enhances bone-tendon integration in vitro*. Connective tissue research, Band 57, Auflage 2, Seite 99-112. (Schwarting, 2016)

Nachdem in diesem Kapitel die Vorversuche und der konzeptionelle Versuchsaufbau inklusive der zu beantwortenden Fragenstellungen ausführlich beschrieben wurden, geht das nachfolgende Kapitel **2. Material und Methoden** detailliert auf die verwendeten Materialien und die eingesetzten zellbiologischen Verfahren und molekularbiologischen Methoden ein.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien, Chemikalien, Geräte

2.1.1 Chemikalien, Plastikwaren und allgemeine Reagenzien

Alle Standardchemikalien, allgemeine Plastikwaren und Reagenzien, die in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten Einsatz fanden, wurden in analytischer Qualität und – insofern nicht anderweitig angegeben oder vermerkt – von den folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) und Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland).

Alle für die Zellkultivierung und für die Co-Kultivierung genutzten Plastikwaren, Medien, Pufferlösungen und Materialien wurden in analytischer Qualität von folgenden Unternehmen erworben: Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland), Thermo Fisher Scientific / Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) und Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland).

2.1.2 Geräte

Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen sowie die meisten Lösungen wurden vor Gebrauch mittels eines Horizontalautoklaven des Modells 3850 EL (Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande) und entsprechend vordefinierter Sterilisationsprogramme autoklaviert.

Das zur Herstellung von Lösungen und Puffer verwendete, doppelt entsalzte Wasser entstammte einer Milli-Q Direct-Deionisierungsanlage (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Zur Gewährleistung der Sterilität bei sämtliche Zellkultur-Arbeiten wurden die Sicherheitswerkbänke des Typs HERAsafe HS 12 (Heraeus Materials Technology GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland) und vom Modell BIO II A (Azbil Telstar S.L., Terrassa, Barcelona) verwendet.

Bei Zentrifugationsschritten kamen die Zentrifugen des Modells Labofuge 400 R (Heraeus Materials Technology GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland) und Biofuge 13 (Heraeus Materials Technology GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland) zum Einsatz.

Als Inkubator für die Zellkultur fand der CO₂-Begasungsbrutschrank des Modells HERAcell 150i (Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) Verwendung.

Für die mikroskopischen Untersuchungen der Zellen und des Zellwachstums wurden einerseits das Durchlichtmikroskop Laborlux S (Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) und andererseits das inverse Labormikroskop Leica DM IL LED mit dem digitalen Kamerasystem Leica EC3 (Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) eingesetzt.

Um die RNA-Extraktionen zu quantifizieren, wurde ein NanoDrop ND-1000 Mikrovolumen-Spektralphotometer (Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) genutzt.

Ein FlexCycler mit Thermalblock-Modell Twinblock 48 (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) fand bei der cDNA-Synthese der zuvor isolierten RNA-Proben Verwendung. Zur Durchführung der quantitativen real-time PCRs wurde ein Thermozykler des Modells CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) eingesetzt.

2.1.3 Zelllinien

Mit Beginn der biologischen Forschung wurde der Wunsch der Wissenschaftler groß, Gewebe und Zellen außerhalb des Ursprungs-Organismus (*in vitro*) halten zu können, um direktere und intensivere Untersuchungen durchführen zu können. Dabei wird eine *in vitro*-Kultivierung von Zellen tierischen oder pflanzlichen Ursprungs unter Verwendung spezieller Nährmedien als Zellkultur bezeichnet. Die im Rahmen einer Zellkultivierung verwendeten Zellen werden als Zelllinien bezeichnet, wobei man primäre von sekundären Zelllinien unterscheidet. Bei der Verwendung von Primärkulturen werden Zellen verwendet, die direkt aus einem Gewebe gewonnen und entnommen wurden und nicht immortalisiert sind. Bei sekundären Zelllinien handelt es sich um immortalisierte Zellen, die im Laufe der Zellkultur theoretisch zur unbegrenzten Fortpflanzung beziehungsweise Teilung fähig sind.

In den Pionierarbeiten von Wilhelm Roux (Roux, 1883) und Alexis Carrel (Carrel, 1912; Carrel, 1913) gelang es erstmalig, Zellen über einen gewissen Zeitraum außerhalb des Ursprung-Organismus zu erhalten beziehungsweise zu kultivieren. Unter Berücksichtigung des Hayflick-Limits (Hayflick, 1965) besitzt der Großteil kultivierter diploider Zellen – bis auf einige von Tumoren entspringenden Zellen – eine eingeschränkte Zellkultur-Lebensspanne, da die Zellen nach einer bestimmten Teilungs-Anzahl in den Status der teilungsunfähigen Seneszenz gehen. Otto Gey und seiner Frau Margaret gelang es 1951 am Johns Hopkins Hospital erstmalig, eine immortalisierte Zellkultur zu etablieren, welche als

sogenannten HeLa-Zellen (Lorenz, 2006) bekannt wurden und einem Cervixkarzinom einer Frau Henrietta Lacks entstammen. Neben der Unterscheidung in einerseits primäre und sterbliche sowie in andererseits sekundäre und immortalisierte Zellen werden Zelllinien heutzutage auch anhand ihres Wachstumsverhalten eingeteilt. So kann man unter anderem zwischen adhärenenten Zellen und Suspensionszellen unterscheiden.

Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Co-Kultivierung fanden wie in **1.6.3 Studien-Aufbau und konzeptionelle Versuchsplanung** begründet, die adhärenente, prä-osteoblastische Zelllinie MC3T3-E1 (DSMZ-Nummer: ACC-210) und die adhärenente, fibroblastische Zelllinie 3T3 (DSMZ-Nummer: ACC-173) Verwendung. Bei beiden Zelllinien handelt es sich um sekundäre Zelllinien murinen Ursprunges, die vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) – bezogen wurden. Der Einfachheit halber werden die prä-osteoblastischen MC3T3-E1-Zellen nachfolgend auch als Osteoblasten und die fibroblastischen 3T3-Zellen auch als Fibroblasten bezeichnet. In der nachfolgenden **Tabelle 11** sind die Eigenschaften der verwendeten Zelllinien aufgeführt.

	MC3T3-E1	3T3
DSMZ-Nummer	ACC-210	ACC-173
Spezies	Murin (Mus musculus)	Murin (, Mus musculus)
Zelltyp, Herkunft	Fibroblasten aus der Schädelkalotte (Calvaria), von C57BL/6-Maus-Embryo / -Fetus stammend	Fibroblasten, von Swiss Albino-Maus-Embryo / -Fetus stammend
Differenzierung	Osteoblastisch	Fibroblastisch
Morphologie	Adhärenentes, osteoblasten-ähnliches Wachstum als Monolayer mit Kontakt-Inhibition	Adhärenentes, fibroblasten-spezifisches Wachstum als Monolayer mit Kontakt-Inhibition
Medium	80-90% Alpha-MEM (α MEM) + 10-20% FBS + 2 mM L-Glutamin	90-95% Dulbecco's MEM (DMEM) + 5-10% FBS
Subkultivierung	Passagierung bei Konfluenz von 80-90% im Verhältnis 1:3 bis 1:4 1-2x pro Woche, Aussaat von ungefähr $1-2 \cdot 10^6$ Zellen / 80 cm^2	Passagierung bei Konfluenz von 60-70% im Verhältnis bis zu 1:8 jeden 2.-4. Tag, Aussaat von ungefähr $1-2 \cdot 10^6$ Zellen / 175 cm^2
Inkubation	Bei 37°C mit 5% CO_2	Bei 37°C mit 5% CO_2
Verdopplungszeit	Ungefähr 24-48 Stunden	Ungefähr 40 Stunden
Zell-Ernte	Ungefähr $6-7 \cdot 10^6$ Zellen / 80 cm^2 oder $9 \cdot 10^6$ Zellen / 175 cm^2	Ungefähr $5-8 \cdot 10^6$ Zellen / 175 cm^2
Lagerung, Aufbewahrung	Gefroren in 70% Medium, 20% FBS, 10% DMSO, ungefähr $3 \cdot 10^6$ Zellen	Gefroren in 70% Medium, 20% FBS, 10% DMSO, für $1,5 \cdot 10^6$ Zellen

Tabelle 11: Eigenschaften der verwendeten osteoblastischen und fibroblastischen Zelllinien

2.1.4 Enzyme und Kits

Für die Aufreinigung und Purifikation des Transkriptoms der MC3T3-E1- und 3T3-Zellen kam das RNA-Isolations-Kit NucleoSpin RNA der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) zum Einsatz. Für die anschließende Generierung einer cDNA-Bibliothek mittels Reverser Transkription wurde das Kit iScript cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) genutzt. Vom gleichen Unternehmen wurde ebenfalls das Kit SsoFast EvaGreen Supermix für die Durchführung der qRT-PCR-Analyse bezogen.

Wie im Abschnitt **1.6.3 Studien-Aufbau und konzeptionelle Versuchsplanung** erwähnt, wurde zur Analyse der Wirkung von rhBMP7 auf die osteoblastischen und fibroblastischen Zellen im Co-Kultivierungs-Modell auf das für bestimmte klinische Einsatzgebiete zugelassene Osigraft eptoterminal alpha zurückgegriffen. Das in einer Menge von 1 g von der Firma Stryker GmbH & Co. KG (Duisburg, Deutschland) bezogene Pulver, welches eine gesamte Wirkstoffmenge von 3,5 mg rhBMP7 enthielt, wurde in 7 ml steriler Natriumchloridlösung gelöst, um eine so genannte Stock-Lösung mit einer Konzentration von $0,5 \text{ mg/ml} \pm 500 \text{ µg/ml}$ rhBMP7 zu erhalten. Diese Stock-Lösung wurde für die dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchsdurchführungen in mehrere Aliquots aufgeteilt und dabei im Verhältnis 1:4 diluiert. So wurde 1 ml der zuvor genannten Stock-Lösung mit einer Konzentration von 500 µg/ml rhBMP7 mit 4 ml steriler Natriumchloridlösung weiterverdünnt und damit eine Intermediat-Lösung mit 5 ml Volumen und einer rhBMP7-Konzentration von 100 µg/ml erhalten. Diese Intermediat-Lösung wurde dann im Rahmen der Stimulations-Versuche eingesetzt.

2.1.5 Oligonukleotide

Wie im Unterkapitel **1.6.3 Studien-Aufbau und konzeptionelle Versuchsplanung** erläutert, wurden die in der **Tabelle 12** dargestellten Zielgene analysiert. Nachfolgend werden in dieser Arbeit anstelle der vollständigen Namen des Zielgenes der Einfachheit halber die in der Tabelle dargestellten Abkürzungen als Zielgen-Name verwendet.

Zur Analyse der Zielgene Alp1, Bglap, Col1a1, Runx2 und Spp1 fand eine Normalisierung der Expression besagter Gene auf die Expressionslevel der beiden Referenzgene Actb und Hprt statt, wobei diese Housekeeping-Gene der Vollständigkeit halber ebenfalls in der **Tabelle 12** aufgelistet werden.

Abkürzung des Gens	Vollständiger Name des Gens (englischer Name)	Gen-Typ
Actb	Beta- / β -Aktin (actin beta)	Referenzgen
Alp1	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase 1 (bone-specific alkaline phosphatase 1)	Zielgen
Bglap	Osteocalcin, Knochenspezifische γ -Carboxylglutamat-Protein (bone gamma-carboxylglutamate protein, osteocalcin)	Zielgen
Col1a1	Kollagen Typ 1, Alpha 1-Kette (collagen type 1, alpha 1 chain)	Zielgen
Hprt1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1)	Referenzgen
Runx2	Runt-ähnlicher Transkriptionsfaktor 2 (runt-related transcription factor 2)	Zielgen
Spp1	Osteopontin, sezerniertes Phosphoprotein 1 (secreted phosphoprotein 1, osteopontin)	Zielgen

Tabelle 12: Zielgene und Referenzgene mit Abkürzungen und vollständigem Namen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Durchführung der quantitativen real-time PCRs die in der nachfolgend abgebildeten **Tabelle 13** samt Primer-Sequenzen dargestellten Oligonukleotide verwendet.

Zielgen-Name	Amplikon-Größe [bp]	Annealing-Temperatur [°C]	Primer-Sequenzen			
Actb	200	66,5	Vorwärts	5'	CTCTGGCTCCTAGCACCATGAAGA	3'
		66,3	Rückwärts	5'	GTAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	3'
Alp1	96	61,3	Vorwärts	5'	GGCCAGCTACACCACAACA	3'
		60,0	Rückwärts	5'	CTGAGCGTTGGTGTATATGTCTT	3'
Bglap	102	Kommerzielles Produkt (Qiagen Mm_Bglap_1_SG QuantiTect Primer Assay, Katalognr.: QT00259406), Sequenzen / Annealing-Temperatur nicht verfügbar				
Col1a1	91	60,5	Vorwärts	5'	GTCCTCTTAGGGGCCACT	3'
		64,0	Rückwärts	5'	ATTGGGGACCCTTAGGCCAT	3'
Hprt1	173	67,1	Vorwärts	5'	GAGGAGTCCTGTTGATGTTGCCAG	3'
		66,4	Rückwärts	5'	GGCTGGCCTATAGGCTCATAGTGC	3'
Runx2	207	60,3	Vorwärts	5'	CCAACCGAGTCATTTAAGGCT	3'
		60,8	Rückwärts	5'	GCTCACGTCGCTCATCTTG	3'
Spp1	134	60,3	Vorwärts	5'	AGCAAGAACTCTTCCAAGCAA	3'
		63,0	Rückwärts	5'	GTGAGATTTCGTCAGATTCATCCG	3'

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten qRT-PCR-Oligonukleotide

Die zuvor als Primer bezeichneten Nukleotidsequenzen wurden von den Firmen Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Alle aufgeführten Primer-Sequenzen überspannen mindestens eine Exon-Intron-Grenze, wodurch sichergestellt wird, dass ausschließlich eine Amplifikation von DNA genomischen Ursprunges (so genannte cDNA) stattfindet und keine Amplifikation von verbleibenden, im Sinne einer Kontamination eventuell noch vorhandener RNA-Molekülen erfolgt.

Wie bereits im vorherigen Unterkapitel erwähnt, wurde im Rahmen der dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuche das Enzym-Kit SsoFast EvaGreen Supermix verwendet. Da laut Herstellerangaben eine Konzentration von 300-500 nM pro Primer empfehlenswert ist, wurden für die qRT-PCR-Ansätze Primer-Paar-Mixe für die von Sigma-Aldrich bezogenen Primer Actb, Alp1, Col1a1, Hpvt, Runx2 und Spp1 hergestellt. Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit festgelegt, dass eine finale Konzentration von 400 nM für jeden Primer und jeden qRT-PCR-Ansatz eingesetzt werden soll. Da die Primer in 2 ml Stock-Lösung mit einer Konzentration von 100 μ M vorlagen, wurden die Primer-Paar-Aliquots durch 40 μ l der Vorwärts-Primer-Stock-Lösung, 40 μ l der Rückwärts-Primer-Stock-Lösung und 920 μ l Nuklease-freiem Wasser erhalten. Dadurch enthielten die Primer-Paar-Mixe eine Konzentration von jeweils 4 μ M = 4000 nM der beiden Primer, so dass durch die Verwendung von je 2 μ l dieser Primer-Paar-Lösungen in einem Gesamtvolumen von 20 μ l für jeden qRT-PCR-Ansatz die gewünschte finale Primer-Konzentration von 400 nM sowohl für den Vorwärts-Primer als auch für den Rückwärts-Primer resultierten. Für die Bglap-Primer, die von der Firma Qiagen als kommerzielle QuantiTect Primer Assay bezogen wurden, waren keine Konzentrationsangaben verfügbar, weshalb für dieses Primer-Paar gemäß den Hersteller-Angaben beziehungsweise dem Hersteller-Handbuch entsprechend 2 μ l der Primer-Lösung eingesetzt wurden.

2.2 Zellbiologische Methoden

Sämtliche Arbeiten mit und Anwendungen an den Zellkulturen einschließlich der Co-Kultivierung bis hin zum Punkt der Ablösung der Zellen fanden unter sterilen Bedingungen und unter Verwendung von Sicherheitswerkbänken statt, welche vor Anfang und nach Beendigung jeglicher Tätigkeit mittels 70% Ethanol und per UV-Bestrahlung über die in den Sicherheitswerkbänken integrierten UV-Lampen desinfiziert wurden.

2.2.1 Zelllinien-Kultivierung

Die beiden verwendeten Zelllinien muriner Herkunft wurden bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank kultiviert. Dabei fand die Kultivierung der prä-osteoblastischen Zelllinie MC3T3-E1 in Gibco Minimal Essential Medium Alpha Modification (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), im Weiteren als α MEM abgekürzt, und die Kultivierung der fibroblastischen Zelllinie 3T3 in Gibco Dulbecco's Modified Eagle's Medium GlutaMAX High Glucose (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), nachfolgend mit DMEM bezeichnet, statt. Beiden Medien wurde 10% fetales Rinderserum der Marke FBS Superior (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), nachfolgend nur mit FBS (englisch für fetal bovine serum) abgekürzt, supplementiert und weiterhin um 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin (Gibco Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml 100x, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), nachfolgend als PenStrep bezeichnet, ergänzt.

Für die genaue Herstellung beider Kultivierungsmedien sei auf die im Anhang dargestellten Protokolle **10.2.1 Protokoll zur Herstellung von Osteoblasten-Medium** beziehungsweise **10.2.2 Protokoll zur Herstellung von Fibroblasten-Medium** verwiesen.

Nach Bezug der vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – bezogenen, kryokonservierten Zellen erfolgte zunächst das Auftauen in 37°C warmen Wasser. Da beim Einfrierprozess Dimethylsulfoxid, kurz DMSO, zur Verhinderung einer Zellintegritäts-störender Eiskristallbildung eingesetzt wurde, erfolgte zur Eliminierung dieser Substanz eine Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 1200 rpm – entspricht ungefähr 240x g – mit anschließender Medium-Entfernung und dem Resuspendieren des Zellpellet in α MEM für die Osteoblasten beziehungsweise in DMEM für die Fibroblasten. Anschließend wurden die MC3T3-E1- und die 3T3-Zellen als 1. Passage zur Kultivierung in Zellkulturflaschen des Typs CELLSTAR der Firma Greiner Bio One GmbH (Frickhausen, Deutschland) mit einem maximalen Volumen von 550 ml und einer Wachstumsfläche von 175 cm² überführt und im Begasungsbrutschrank inkubiert. Den

genauen Vorgang zum Auftauen der Zellen und zur Anlage der primären Zellkultur ist im Protokoll **10.2.4 Protokoll zum Auftauen von MC3T3-E1- respektive 3T3-Zellen** im Anhang dokumentiert.

Gemäß gängiger zellmikrobiologischer Standarde im Umgang mit Zellkulturen fanden alle 2-3 Tage regelmäßige Wechsel der beiden Kulturmedien α MEM und DMEM statt.

Die detaillierte Vorgehensweise ist im Anhang im Protokoll **10.2.5 Protokoll zum Wechsel von Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Medium** festgehalten.

2.2.2 Zelllinien-Passagierung

Bei einem Konfluenzgrad der MC3T3-E1- und 3T3-Zellen von ungefähr 70-80% erfolgte zur Beibehaltung der Mitose-Fähigkeit der Zellen und zur Vermeidung der Wachstums-Stagnation und des Alterungsprozesses der Zellen das Umsetzen der Mutterkultur in eine oder mehrere neue Subkulturen beziehungsweise Tochterkolonien. Dieser Vorgang wird nachfolgend auch als Passagierung bezeichnet, wobei die Passage-Nummer die Anzahl an durchgeführten Subkultivierungen widerspiegelt.

Nach Abnahme des Kulturmediums mit Hilfe einer Glaspipette erfolgte mittels Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), nachfolgend auch als PBS abgekürzt, ein Waschschriff der Zellen. Dabei wurde zur Entfernung etwaiger Kulturmedium-Überreste – das noch enthaltenen FBS würde mit dem im nächsten Schritt supplementierte Trypsin/EDTA interagieren und dessen Wirkung reduzieren – PBS hinzugegeben und nach leichtem Schwenken der Gewebekulturflasche der gesamte Flüssigkeitsüberstand erneut mittels Glaspipette verworfen. Für das anschließende Ablösen der adhärenen Zellen vom Boden der Gewebekulturflasche, im Weiteren auch mit dem Begriff Detachment beschrieben, wurde Trypsin/EDTA-Lösung 0,05%/0,02% in PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verwendet und die Zellen für 3 min bei 37°C bis zur ihrer Abrundung inkubiert. Nach leichtem Beklopfen der Zellkulturflaschen zur Ablösung randständiger Zellen sowie nach makroskopischer und mikroskopischer Validierung des Zell-Detachments wurde die enzymatische Zell-Adhäsionolyse durch Zugabe des dreifachen Kulturmedium-Volumens gestoppt und damit die Trypsin-Wirkung neutralisiert. Die anschließend erhaltene Zell-Trypsin-Suspension wurde für 5 min bei 1200 rpm – entspricht ungefähr 240x g – pelletiert, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und entsprechend der gewünschten Zieldichte in einem Passagierungs-Verhältnis zwischen 1:2 und 1:5 in neue Gewebekulturflaschen überführt und ausgesät. Am Folgetag der Zelllinien-Passagierung erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums.

Die einzelnen Schritte der Subkultivierung sind im Protokoll **10.2.6 Protokoll zur Sub-Kultivierung von MC3T3-E1- respektive 3T3-Zellen** im Anhang dokumentiert.

Um eine eventuelle Kontamination zu vermeiden beziehungsweise um das Risiko für eine solche Verunreinigung möglichst gering zu halten, wurden PBS und Trypsin/EDTA-Lösung sowohl für beide Zelllinien als auch für die Co-Kultivierungs-Versuche getrennt vorbereitet, gelagert und eingesetzt.

2.2.3 Zell-Präparation und -Quantifikation

Für die im Rahmen dieser Studie zugrundeliegenden Versuchsdurchführungen wurden die in der nachfolgenden **Tabelle 14** dargestellten Zelllinien-Passagen verwendet.

	MC3T3-E1-Zellen (Osteoblasten)	3T3-Zellen (Fibroblasten)
Singuläre rhBMP7-Stimulation	6. Passage	8. Passage
Multiple rhBMP7-Stimulation	7. Passage	9. Passage

Tabelle 14: Übersicht über die für die Co-Kultivierung verwendeten Passagen der MC3T3-E1- und 3T3-Zellen

Da im Rahmen der singulären und multiplen Stimations-Versuche große Mengen von osteoblastischen und fibroblastischen Zellen zum Einsatz kamen, erfolgte die gleichzeitige Verwendung mehrerer Gewebekulturflaschen der oben genannten Passagen zur Generierung einer ausreichend großen, gepoolten Zell-Suspension. Die Präparation, also das Ablösung der Zellen aus den Gewebekulturflaschen, wird im weiteren Verlauf auch als Zell-Ernte bezeichnet.

Initial wurde nach Entfernung des DMEM-Kulturmediums und nach einem Waschschrift der Zellen mit PBS eine enzymatische Ablösung der adhären Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen induziert, wozu Trypsin/EDTA wie im vorherigen Subkapitel bereits beschrieben eingesetzt wurde. Anschließend erfolgte nach Inkubation der Zellen für 3 min bei 37°C die Neutralisation der Endopeptidase-Wirkung durch Hinzugabe des dreifachen Volumens an DMEM. Die resultierenden Zell-Suspensionen aus den verwendeten Gewebekulturflaschen wurden für 5 min bei 1200 rpm – entspricht ungefähr 240x g – zentrifugiert und der jeweilige flüssige Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in einem Volumen von 1 ml des im nachfolgenden Abschnitt **2.2.4 Vorbereitung der Co-Kultivierung** beschriebenen Differenzierungs-Kulturmediums resuspendiert.

Da in den Co-Kultivierungs-Versuchen wie in **1.6.3 Studien-Aufbau und konzeptionelle Versuchsplanung** beschrieben pro Gewebekulturschale jeweils genau 1.000.000, also $1 \cdot 10^6$, Osteoblasten beziehungsweise Fibroblasten eingesetzt wurden, erfolgte im Anschluss die Bestimmung der Zellzahl beziehungsweise der Zellkonzentration in der Zellsuspension, wozu als Hämocytometer eine Neubauer Zählkammer ohne Federklemmen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt wurde. Auf Basis der mittels Zählkammer bestimmten Werte wurden die benötigten Volumina der geernteten Zellsuspensionen berechnet und diese zu einem gemeinsamen Zell-Pool assembliert, welcher die erforderliche Anzahl an Zellen enthielt.

Die einzelnen Schritte zur Ernte der MC3T3-E1- respektive der 3T3-Zellen sind detailliert im Protokoll **10.2.7 Protokoll zur Ernte der MC3T3-E1- respektive 3T3-Zellen** im Anhang beschrieben.

2.2.4 Vorbereitung der Co-Kultivierung

Da beide Zelllinien in unterschiedlichen Nährmedien kultiviert wurden – die MC3T3-E1-Zellen in α MEM und die 3T3-Zellen in DMEM – erforderte eine gleichzeitige Anzucht im Rahmen der Co-Kultivierungs-Versuche eine Kulturmedium-Umstellung einer der beiden eingesetzten Zelllinien auf das Nährmedium der anderen Zellen. Da es sich bei DMEM um eine unter anderen um einige Aminosäuren erweiterte Version des MEM handelt, erfolgte zehn Tage vor dem Beginn der jeweils Co-Kultivierungs-Versuche die Inkubation der MC3T3-E1-Zellen in DMEM zur Vermeidung einer Mangelnutrition. Diese Anpassungs- und Gewöhnungszeit für die osteoblastischen Zellen sollte einer Verzerrung der Ergebnisse aufgrund der Nährmedium-Umstellung vorbeugen.

Während der Co-Kultivierungs-Versuche sollte möglichst eine osteogene und fibrogene beziehungsweise tenogene Differenzierung der MC3T3-E1- und der 3T3-Zellen erfolgen. Daher wurden beide Zelllinien während des gesamten Co-Kultivierungs-Experimentes mit einem so genannten Differenzierungs-Kulturmedium kultiviert, welches nachfolgend auch als Differenzierungsmedium bezeichnet wird. Dieses Differenzierungsmedium basierte auf dem DMEM-Medium, wobei neben 10% FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin auch 10 μ g/ml L-Ascorbinsäure-2-phosphat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 1 mM β -Glycerophosphat Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) supplementiert wurden.

Für die genaue Herstellung des Differenzierungsmediums sei auf das zugehörige Protokoll **10.2.3 Protokoll zur Herstellung von Differenzierungs-Medium** im Anhang verwiesen.

Wie im Abschnitt **1.6.3 Studien-Aufbau und konzeptionelle Versuchsplanung** beschrieben, fand in dieser Arbeit ein Osteoblasten-Fibroblasten-Co-Kultivierungs-Modell basierend auf Wang *et al.* (2007) Verwendung. Dabei wird in diesem Modell eine Gewebekulturschale des Typs CELLSTAR 100 mm x 20 mm (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit einem Maximalvolumen von 100 ml, einem Arbeitsvolumen von 16-17 ml und einer Wachstumsfläche von 58 cm² als Grundlage eingesetzt, welche mittels temporär eingelegter, zuvor vorbereiteter 4%iger Agarose-Schicht mit einer Breite von 12 mm getrennte Wachstumsbereiche einerseits für die Osteoblasten und andererseits für die Fibroblasten bereithielt. Dazu wurde die Zellkultur-getestete Certified Megabase Agarose des Unternehmens Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) verwendet. Die **Abbildung 11** stellt diesen Vorgang schematisch dar und zeigt die im weiteren Verlauf auch als Divider bezeichnete 12 mm breite Agarose-Trennschicht im neu entstandenen Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-System.



Abbildung 11: Schema des Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-Systems

Die beiden Bereiche im Co-Kultivierungs-Modell wurden rückseitig für die Aufnahme der Osteoblasten mit der Abkürzung „OB“ und für die Aufnahme der Fibroblasten mit der Kurzform „FB“ gekennzeichnet. Das Protokoll **10.2.8 Protokoll zur Herstellung von Co-Kultivierungs-Gewebekulturschalen** dokumentiert die Herstellung der Co-Kultivierungs-Gewebekulturschalen, welche nachfolgend der Einfachheit halber auch als Co-Kultivierungs-Schalen bezeichnet wird, samt Erstellung des Agarose-Dividers.

Zur Generierung einer repräsentativen Menge an behandelten Zellen wurden mehrere Exemplare beziehungsweise Replikate des Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-Systems hergestellt. Um alle drei experimentellen Zeitpunkte – also die Zeitpunkte „3 Tage“, „7 Tage“ und „10 Tage“ – und alle untersuchten rhBMP7-Konzentrationen – genauer gesagt die Konzentrationen „0 ng/ml“, „100 ng/ml“, „250 ng/ml“ und „500 ng/ml“ – mittels dreier biologischer Replikate abzudecken, waren $3 * 4 * 3 = 36$ Co-Kultivierungs-Systeme

notwendig. Da sowohl eine Versuchsreihe mit singulärer als auch mit multipler rhBMP7-Stimulation durchgeführt wurden, verdoppelt sich die Anzahl der benötigten Co-Kultivierungs-Systeme auf die Gesamtzahl von 72 Zwei-Kammer-Systeme.

Die Kennzeichnung und Konzeption dieser 72 Zwei-Kammer-Systeme ist aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang unter dem Punkt **10.1.1 ID-Liste für die Zwei-Kammer-Co-Kultivierung** aufgeführt.

2.2.5 Co-Kultivierung und rhBMP7-Stimulation

Nachdem die Abschnitte **2.2.3 Zell-Präparation und -Quantifikation** und **2.2.4 Vorbereitung der Co-Kultivierung** einerseits auf die Ernte und damit die Bereitstellung der benötigten MC3T3-E1- beziehungsweise 3T3-Zellen und andererseits auf die Vorbereitung der Zwei-Kammer-Systeme eingegangen sind, beschreibt dieser Abschnitt die eigentliche Co-Kultivierung der Osteoblasten und Fibroblasten samt der Supplementierung des rhBMP7-Wirkstoffes.

Nach Präparation und Quantifikation der Zellen wurden jeweils 2 ml aus der gepoolten Osteoblasten- beziehungsweise Fibroblasten-Suspension mit jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen – das entspricht einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml – in die gekennzeichneten Bereiche jeden Exemplars des Co-Kultivierungs-Modells ausgesät. Eine anschließende Inkubation der Zellen für 10 min unter sterilen Bedingungen sollte die fokale Adhäsion der Zellen am Boden der Gewebekulturschalen gewährleisten, wonach im weiteren Verlauf Kulturmedium im Volumen von 6 ml hinzugegeben wurde. Daraus ergab sich ein Gesamtvolumen an 10 ml Nährmedium pro Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-System. Die nachfolgend dargestellte **Abbildung 12** stellt die beschriebenen Schritte graphisch dar.

In dem so entstandenen Zwei-Kammer-System wurden die beiden räumlich getrennten Zelllinien zwei Tage bis zu einer Konfluenz von ungefähr 70-80% kultiviert, wonach das verbliebene Kulturmedium mittels Glaspipette vollständig abgesaugt wurde. Anschließend erfolgte die Entfernung der transienten Agarose-Trennschicht, so dass dieser zellfreie Bereich eine Fläche für die Migration, das Einwachsen und damit für die interzelluläre Interaktion der osteoblastischen und fibroblastischen Zellen bereitstellte. Da diese Fläche der Gewebekulturschale sich als eine Art Schnittstelle zwischen den Arealen beider eingesetzten Zelllinien darstellt, wird es nachfolgend auch als Interface respektive Interface-Bereich bezeichnet.

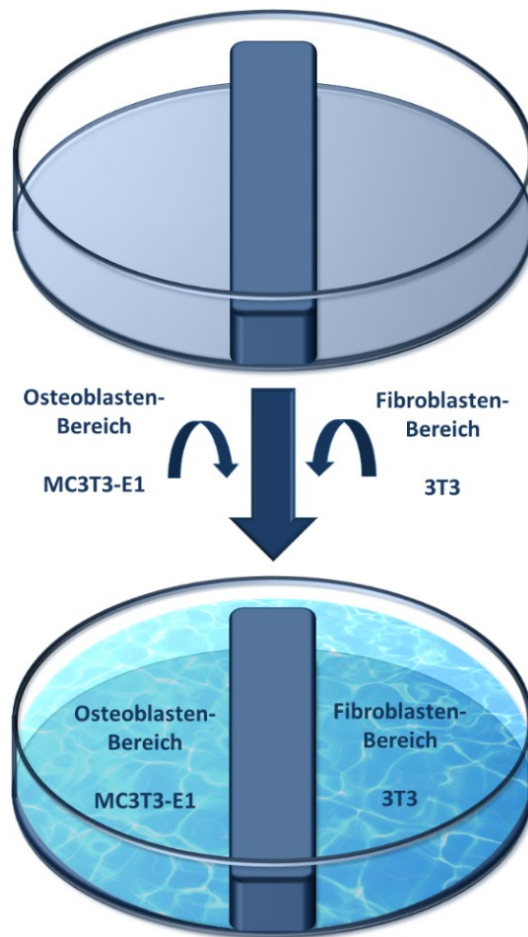


Abbildung 12: Schema der Zell-Aussaat in die Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-Systeme

Nachdem die Agarose-Trennschicht beseitigt wurde, erfolgten die Applikation des rhBMP7-Volumens und die erneute Zugabe von Differenzierungsmedium, um ein Gesamtvolumen von 10 ml pro Co-Kultivierungs-Schale zu erhalten. Die **Abbildung 13** verdeutlicht den Schritt der Entfernung des Dividers und damit die Freilegung des Interface-Bereiches sowie die rhBMP7-Stimulation.

Um die gewünschten Konzentrationen für die Co-Kultivierungs-Versuche von 100 ng/ml, 250 ng/ml oder 500 ng/ml zu erreichen, wurden bei einem Gesamtvolumen von 10 ml pro Co-Kultivierungs-System die in der **Tabelle 15** aufgeführten Volumina an rhBMP7-Intermediat-Lösung (siehe zur Herstellung dieser Lösung auch Subkapitel **2.1.4 Enzyme und Kits**) und Differenzierungsmedium eingesetzt.

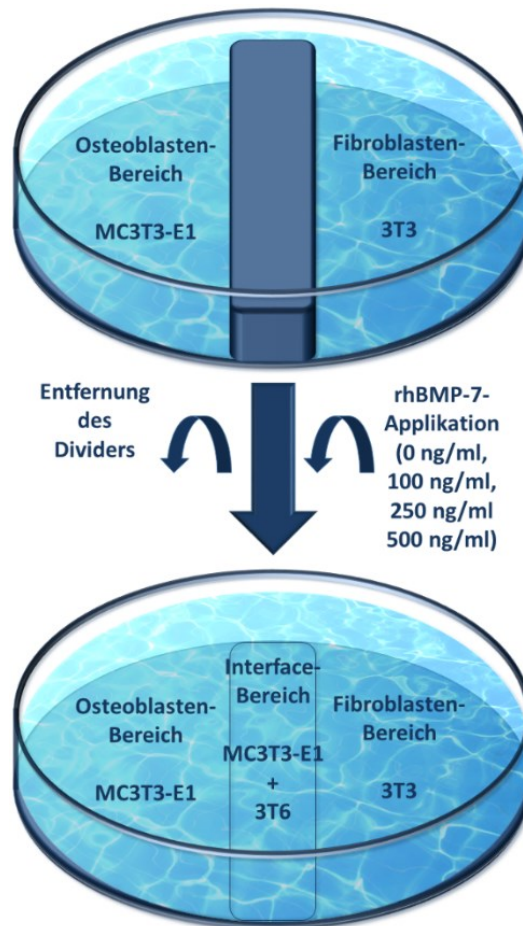


Abbildung 13: Schema der Entfernung des Dividers und der rhBMP7-Applikation

Ziel-Konzentration für Gesamtvolumen von 10 ml	Benötigtes Volumen an rhBMP7-Intermediat-Lösung	Benötigtes Volumen an Differenzierungs-Medium
0 ng/ml	0 µl	10 ml
100 ng/ml	10 µl	9,990 ml
250 ng/ml	25 µl	9,975 ml
500 ng/ml	50 µl	9,950 ml

Tabelle 15: Volumina an rhBMP7-Stock-Lösung und Differenzierungsmedium zum Erhalt der Versuchsdurchführungs-End-Konzentrationen

Nach Erreichen der vordefinierten Zeitpunkte von 3 Tagen, 7 Tagen beziehungsweise 10 Tagen erfolgte wie in **Abbildung 14** dargestellt die Zell-Ernte. Dazu wurde zunächst das Differenzierungsmedium in den zum korrespondierenden Zeitpunkt gehörigen Co-Kultivierungs-Schalen mit Hilfe einer Glaspipette entfernt. Anschließend wurden diese Gewebekulturschalen unter Anwendung von PBS vorsichtig und unter Schonung der adhäsiven Zellen gewaschen. Danach erfolgte mit getrennten Zellschabern des Modells Cell Scrapers 1,35 cm (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) ein behutsames manuelles Ablösen der Zellen aus dem Osteoblasten-, dem Fibroblasten- und dem Interface-Bereich unter visueller Kontrolle.

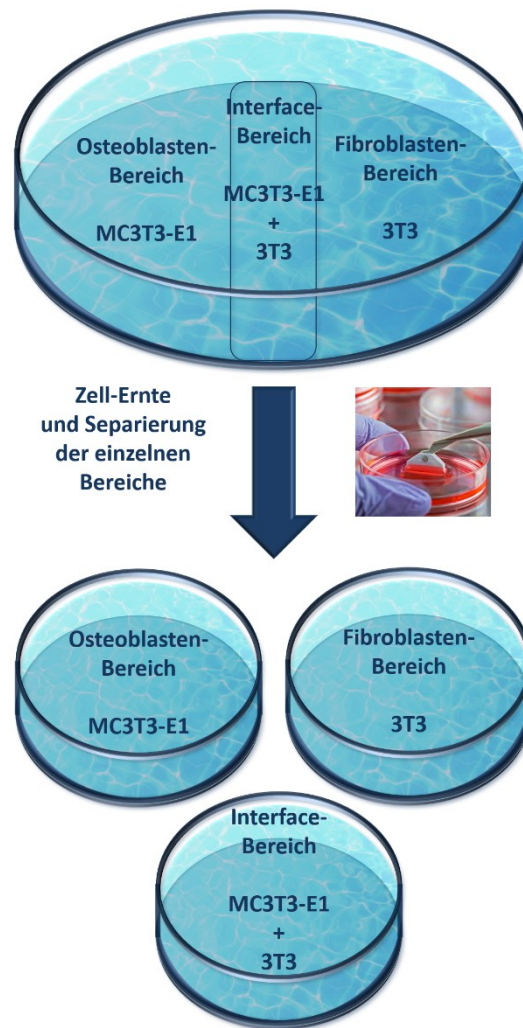


Abbildung 14: Schema der Zell-Ernte aus den unterschiedlichen Bereichen

Die abgelösten Zellen wurden anschließend für jeden dieser Bereiche getrennt im ersten Lyse-Puffer des RNA-Extraktions-Kits – siehe hierzu auch den Abschnitt **2.3.1 Extraktion und Purifikation genomischer RNA** – resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß für die weiteren Schritte der RNA-Purifikation übertragen.

Der vollständige, detaillierte Ablauf der Co-Kultivierung sowie der rhBMP7-Behandlung der Zellen bis hin zur Extraktion der Zellen aus den drei vordefinierten Bereichen ist im Anhang unter dem Protokoll **10.2.9 Protokoll zur Co-Kultivierung inklusive rhBMP7-Stimulation** zu finden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Extraktion und Purifikation genomischer RNA

Die Isolation genomischer RNA aus den osteoblastischen und fibroblastischen Zellen erfolgte mit Hilfe des bereits erwähnten RNA-Extraktions-Kits NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland), welches auf der Extraktionsmethode totaler RNA von Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi (Chomczynski *et al.*, 1987) basiert. Dabei wurden die in der Probe enthaltenen Zellen initial unter denaturierenden Bedingungen lysiert und anschließend mechanisch homogenisiert, wobei RNasen durch die im ersten Lyse-Puffer enthaltenen Guanidiumthiocyanat und β -Mercaptoethanol inaktiviert wurden. Durch Ethanol-Addition wurden in der Probe optimale Bedingungen zur Bindung der RNA-Moleküle an eine Silicagel-Membran generiert, wonach in mehreren Waschschritten Kontaminationen wie beispielsweise Zellmembran-Bestandteile und Proteine über einzelne Säulen und Zentrifugationen beseitigt wurden. Zuletzt ermöglichte die Hinzugabe von RNA-freiem Wasser, die aufgereinigten RNA-Moleküle von der Silicagel-Membran zu eluieren.

Da für die Osteoblasten-, Fibroblasten- und Interface-Bereich jeweils mit einer erhöhten Ausbeute an Zellen und somit an Gesamt-RNA zu rechnen war, wurde das vom Hersteller vorgegebene Standardprotokoll, wie in der Produktbeschreibung angegeben, für höhere RNA-Ausbeuten angepasst. Nachdem das Differenzierungsmedium, wie bereits im Abschnitt **2.2.5 Co-Kultivierung und rhBMP7-Stimulation** beschrieben, entfernt und die Zellen aus den verschiedenen Bereichen der Co-Kultivierungs-Gewebekulturschale mit Hilfe von Zellschabern voneinander separiert wurden, erfolgte die Homogenisierung der Proben und die Lyse der Zellen einerseits mittels Zugabe von adjustierten 600 μ l RA1-Lyse-Puffer und 6 μ l β -Mercaptoethanol und andererseits durch Disruption der Zellen mittels einer Spritze und einer Kanüle mit einem Durchmesser von 0,9 mm, was einem Wert von 20 Gauge entspricht. Anschließend wurde das Lysat über eine Filtration durch einen NucleoSpin Filter mit nachfolgender Zentrifugation für 1 min bei 11.600 rpm – entspricht 11.000 x g – in der zuvor bereits genannten Biofuge 13 gesäubert. Nach Adjustierung der RNA-Bindungs-Bedingungen mittels Hinzugabe eines angepassten Volumens von 600 μ l 70% Ethanol zum Lysat, erfolgte die Zentrifugation zur Bindung der RNA-Moleküle an die Silicagel-Membran. Da das Probenvolumen die Säulenkapazität überstieg, wurde die Zentrifugation zweimalig für jeweils 30 s bei 11.000 x g durchgeführt, um über dieses zweischrittige Vorgehen eine maximale Bindung der RNA-Moleküle an der Silicagel-

Membran zu erzielen. Im weiteren Verlauf wurden die gebundenen Proben mittels 350 µl Membran Desalting Buffer, auch als MDB abgekürzt, und nachfolgender Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g entsalzt. Nach Hinzugabe von 95 µl rekonstituierter rDNase und des rDNase-Reaktions-Puffers wurde das Lysat für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, was der Restriktionsenzym-vermittelten Beseitigung von DNA-Kontaminationen aus den Ansätzen diente. Nach diesem rDNase-Verdau erfolgte mittels der Hinzugabe von 200 µl RAW2-Puffer die Inaktivierung der rDNase und über die zweimalige Hinzugabe von einerseits 600 µl und andererseits 250 µl des RA3-Puffers die doppelte Säuberung der Probe, wonach sich Zentrifugationsschritte von 30 s respektive 2 min bei 11.000 x g anschlossen. Im letzten Schritt konnte die Gesamt-RNA über die Applikation von 40 µl RNA-freiem Wasser und nachfolgender Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g von der Säule eluiert werden, woraufhin die Probe unverzüglich bei -80°C gelagert wurde oder bei direkter Weiterverarbeitung in einem Eisbad zwischengelagert wurde.

Das im Anhang dokumentierte Protokoll **10.2.10** Protokoll zur Extraktion und Purifikation genomischer RNA beschreibt die einzelnen Schritte der RNA-Isolierung bis zur Elution der gewünschten Moleküle.

2.3.2 Photometrische Quantifikation genomischer RNA

Im Anschluss an die RNA-Extraktion erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration der einzelnen Proben, um anschließend eine normierte Menge an RNA-Molekülen in den weiteren Versuchsdurchführungen einzusetzen. Durch den Einsatz einer bestimmten Menge an RNA-Molekülen konnte eine Vergleichbarkeit der Proben untereinander gewährleistet werden. Dazu wurde das von William Wilfinger *et al.* (Wilfinger *et al.*, 1997) beziehungsweise von Philippe Desjardins und Deborah Conklin (Desjardins *et al.*, 2010) beschriebene Prinzip der Messung der optischen Dichte mittels Absorptions-Spektrometrie verwendet.

Im Anschluss an die RNA-Extraktion erfolgte eine photometrische Quantifizierung dieser Nukleinsäuren mit Hilfe des NanoDrop ND-1000, wobei das Gerät zur Konzentrationsbestimmung die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert und einen Wert für die optische Dichte berechnet.

Für die optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm wird auch die Kurzform OD_x und für die Absorption bei einer Wellenlänge von x nm auch die Abkürzung A_x verwendet. Dabei entspricht eine Absorption von 1 OD_{260} – also bei einer Wellenlänge von 260 nm – ungefähr 50 µg/ml dsDNA, 37 µg/ml ssDNA oder 40 µg/ml ssRNA (Mülhardt, 2009).

Neben der photometrischen Konzentrationsbestimmung erlaubt die Bestimmung der OD-Werte unterschiedlicher Wellenlängen und die Bildung eines Quotienten aus zwei Werten eine Aussage über die Qualität beziehungsweise über den Verunreinigungsgrad der untersuchten Probe. Da aromatische Aminosäuren im Wellenlängenbereich von 280 nm ihr Absorptionsoptimum aufweisen, lässt die Bildung des Quotienten A_{260}/A_{280} eine qualitative Auskunft über das Vorliegen beziehungsweise den Grad einer Proteinkontamination der Nukleinsäuren-Lösung zu. Dabei erreicht nach Mülhardt (2009) und Armbrecht (2013) eine reine DNA- beziehungsweise RNA-Probe einen Wert von 1,8 bis 2,0. Wird weiterhin noch die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 230 nm bestimmt und daraus resultierend der Quotienten A_{260}/A_{230} berechnet, kann eine Verunreinigung mit Polysacchariden, Kohlenhydraten oder Peptiden abgeschätzt werden. Entsprechend der Arbeiten von Mülhardt (2009) und Armbrecht (2013) sprechen A_{260}/A_{230} -Werte von $>2,0$ für eine reine Probe von DNA beziehungsweise RNA ohne signifikante Kontamination.

In der vorliegenden Arbeit wurde wie oben genannt der NanoDrop ND-1000 verwendet. Dieser bietet als Vertreter der Mikrovolumen-Spektralphotometer den Vorteil, mit sehr geringen Probe-Volumina auszukommen. Dazu wurde für jede extrahierte Gesamt-RNA-Probe ein Volumen von 1 µl auf die Messeinheit des Photometers gegeben, wonach mittels der mitgelieferten, proprietären Software die Konzentrationsbestimmung erfolgte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die besagten Messwerte nicht hier, sondern im Anhang unter **10.1.5 Ergebnisse der photometrischen RNA-Konzentrations-Bestimmung** tabellarisch aufgeführt.

Wie in diesen Tabellen ersichtlich ist, bewegten sich die RNA-Konzentrationen für die singuläre rhBMP7-Stimulation zwischen 33,4 µg/ml und 1511,5 µg/ml, die durchschnittliche RNA-Konzentration lag bei 370,46 µg/ml. Für den A_{260}/A_{280} -Wert ergab sich ein Maximum von 3,12, ein Minimum von 1,87 und einen Mittelwert von 2,12. Hinsichtlich der A_{260}/A_{230} -Werte resultierte ein Maximum von 2,25, ein Minimum von 1,00 und ein Mittelwert von 1,68. Bei der multiplen rhBMP7-Stimulation zeigte sich ein Minimum der RNA-Konzentration von 37,1 µg/ml, ein Maximalwert von 1.314,7 µg/ml sowie eine durchschnittliche RNA-Konzentration von 305,70 µg/ml. Für die Absorptionswerte ergaben sich einerseits bezüglich des A_{260}/A_{280} -Wertes ein Maximalwert von 2,30, ein Minimalwert von 2,00 und ein Mittelwert von 2,12 und andererseits hinsichtlich des A_{260}/A_{230} -Wertes ein Maximum von 2,32, ein Minimum von 1,01 und ein Mittelwert von 1,70.

Zusammenfassend ergab sich mit einem durchschnittlichen A_{260}/A_{280} -Wert von 2,12 sowohl für die singuläre als auch für die multiple rhBMP7-Stimulation gute Reinheitsgrade ohne höhergradige Hinweise auf Proteinkontaminationen in den Nukleinsäure-Proben. Die A_{260}/A_{230} -Werte von durchschnittlich 1,68 für die singuläre und 2,32 für die multiple rhBMP7-Stimulation dokumentierten ebenfalls gute Purifikationsergebnisse der RNA-Extraktionen ohne Anhalte für signifikante Kontaminationen.

Das Protokoll zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben ist detailliert im **10.2.11 Protokoll zur photometrischen Bestimmung der Konzentration genomischer RNA** aufgeführt. Anhand der Konzentrations-Messwerte konnte das einzusetzende RNA-Volumen zur Synthese von cDNA berechnet werden, worauf das nachfolgende Unterkapitel Bezug nimmt.

2.3.3 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie, welches von Francis Crick 1958 beziehungsweise 1970 (Crick, 1958; Crick, 1970) vermutet und publiziert wurde, beschreibt die Richtung des Informationsflusses der Biomoleküle DNA, RNA und Protein. Dabei postulierte er, dass in der Biologie aus DNA-Informationen RNA-Daten werden, und diese RNA-Informationen in Aminosäure- beziehungsweise Protein-Daten umgesetzt werden. Die Richtung dieses Informationsflusses sei laut Crick immer unidirektional. 1970 konnten David Baltimore, Howard Temin und Satoshi Mizutani (Baltimore, 1970; Temin *et* Mizutani, 1970) zeigen, dass dieses zentrale Dogma durch so genannte reverse Transkriptasen gebrochen wird, die sie in Retroviren nachweisen konnten.

Die molekularbiologische Methode der reversen Transkription basiert dabei auf der Verwendung dieser reverse Transkriptasen, welche auch als RNA-abhängige DNA-Polymerasen bezeichnet werden und die Umschreibung von RNA in DNA katalysieren. Dabei verweist das Adjektiv „revers“ auf die Fähigkeit, die Informationen rückwärts beziehungsweise in die umgekehrte Richtung und entgegen des oben genannten Dogmas zu transportieren.

In einem ersten Schritt wird durch die reverse Transkriptase ein RNA-DNA-Hybrid synthetisiert, indem das Enzym durch seine RNA abhängige DNA-Polymerase-Aktivität einen DNA-Strang an eine einzelsträngige RNA (ssRNA) ergänzt. Anschließend erfolgt durch den RNase H-Anteil der reversen Transkriptase der Abbau des zuvor als Matrize dienenden RNA-Stranges, so dass ein einzelsträngiger, der Original-RNA komplementärer DNA-Strang (ssDNA) verbleibt. Mittels einer inhärenten DNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität

des Enzyms wird zuletzt aus der einzelsträngigen DNA-Kette eine doppelsträngige DNA (dsDNA) synthetisiert. Das nachfolgend dargestellte Schema aus **Abbildung 15** zeigt den Ablauf der reversen Transkription.



Abbildung 15: Prinzip der reversen Transkription

Damit die – wie im vorherigen Abschnitt **2.3.2 Photometrische Quantifikation genomischer RNA** beschrieben – isolierte und quantifizierte RNA als Matrize für die quantitativen Real-Time-PCRs, nachfolgend auch als qRT-PCRs bezeichnet, dienen kann, mussten die RNA-Proben zuvor mittels reverser Transkription in cDNA, Kurzform für complementary-DNA beziehungsweise copy-DNA, umgeschrieben werden. Zur Generierung der cDNA-Bibliothek wurde für die dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchsdurchführungen das iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet.

Das vom Hersteller vorgeschlagene Protokoll zur cDNA-Synthese empfiehlt den Einsatz von 1 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µg, welches sich aus 4 µl iScript Reaction Mix, 1 µl iScript Reverse Transcriptase und einem maximalen Volumen von 15 µl RNA-Probe ergibt. Daher wird mindestens eine RNA-Konzentration 66,67 µl/ml vorausgesetzt, die in den vorliegenden Versuchsdurchführungen für einige RNA-Proben unterschritten wurde.

Um diese Problematik zum umgehen, fand daher im Rahmen dieser Arbeit eine Anpassung und Skalierung des Hersteller-Protokolls statt. So wurde das Gesamtvolumen auf 40 µl verdoppelt, dementsprechend wurden auch 8 µl iScript Reaction Mix und 2 µl iScript Reverse Transcriptase verwendet. Damit konnten maximal 30 µl RNA-Probe in einem Reaktionsansatz verwendet werden, was die minimal erforderliche RNA-Konzentration auf 33,33 µl/ml reduziert beziehungsweise halbiert. Die nachfolgende **Tabelle 16** zeigt die Volumina eines einzelnen Ansatzes zur Herstellung von cDNA aus genomischer RNA.

Komponente	Volumen
iScript Reaction Mix	8 µl
iScript Reverse Transcriptase	2 µl
RNA-Probe	bis zu 30 µl
Nuklease-freies Wasser	Auffüllvolumen auf Gesamtvolumen
Gesamtvolumen	40 µl

Tabelle 16: Volumina zur Generierung von cDNA aus genomischer RNA

Zur Generierung der cDNA wurde wie im Unterkapitel **2.1.2 Geräte** beschrieben ein FlexCycler mit Twinblock 48-Thermalblock eingesetzt. Gemäß den Angaben des iScript cDNA Synthesis Kit wurde das in der **Tabelle 17** abgebildete Inkubations-Protokoll verwendet.

Inkubations-Protokoll für die cDNA-Synthese
5 Minuten bei 25° C
30 Minuten bei 42° C
5 Minuten bei 85° C

Tabelle 17: Inkubations-Protokoll zur Generierung von cDNA aus genomischer RNA

Dabei wurden je nach Konzentration der RNA-Extraktionen aus den Osteoblasten-, Fibroblasten- und Interface-Bereiche unterschiedliche Pipettierschemata benötigt. Die Ansatz-Volumina zur cDNA-Generierung sind der Übersicht halber im Anhang angeführt, siehe diesbezüglich den Abschnitt **10.1.6 Ergebnisse der Generierung von cDNA aus genomischer RNA**.

Da in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente eine große Anzahl an Genen untersucht wurden, fand zur Generierung genügender cDNA-Mengen nach der cDNA-Synthese ein Verdünnungsschritt der erhaltenen Proben statt. So wurden für jeden cDNA-Ansatz 20 µl aus dem Gesamtvolumen von 40 µl entnommen und dann im Verhältnis 1:3 mit 60 µl an Nuklease-freiem Wasser diluiert. Diese Verdünnungen wurde dann wie im nachfolgenden Abschnitt **2.3.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)** beschrieben zur

Untersuchung der Zielgen-Expressionen verwendet. Das im Anhang dargestellte Protokoll **10.2.12 Protokoll zur Erstellung von cDNA aus genomischer RNA** beschreibt detailliert die zuvor beschriebenen Schritte der cDNA-Synthese.

2.3.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Neben den Techniken der Zellkultivierung stellte die quantitative real-time PCR, welche nachfolgend als qRT-PCR abgekürzt wird, eine zentrale Methodik im Rahmen dieser Arbeit dar.

Kary Banks Mullis schuf 1983 die Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, kurz PCR) zur *in vitro*-Amplifikation von DNA und publizierte diese Methode 1988 in Science (Mullis *et al.*, 1988), wobei dieses Verfahren 1993 zusammen mit Michael Smith mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Diese Technik wurde in den nachfolgenden Jahren und Jahrzehnten weiterentwickelt und dadurch eine Vielzahl von Anwendungsgebieten über die verschiedenen, abgewandelten Varianten der ursprünglichen PCR-Methodik erschlossen. Die auch in dieser Arbeit verwendete quantitative real-time PCR wurde zu Beginn der 1990er Jahre entwickelt und kombiniert die PCR-Technik zur DNA-Amplifikation mit der Quantifizierung der entstehenden PCR-Produkte mittels „live“-Detektion und -Visualisierung von Fluoreszenzen (Bente, 2003). Diese Fluoreszenz wird über den Einsatz DNA-interkalierender Chemikalien vermittelt, die erst bei Interkalation in die DNA eine fluoreszente Emission generieren. Dadurch war es erstmalig möglich, die DNA-Amplifikationen pro PCR-Zyklus in Echtzeit (engl. real-time) zu beobachten und aufgrund der Proportionalität des Fluoreszenz-Anstiegs zum Konzentrations-Anstieg des Amplifikationsproduktes Rückschlüsse aus diesem Zunahmeverhalten auf die ursprüngliche DNA-Menge zu ziehen (Ishiguro *et al.*, 1995; Wittwer *et al.*, 1997). Aufgrund der hierdurch verfügbaren Möglichkeit, die Kinetik einer PCR-Reaktion zu beobachten, wurde von Walker (2002) für die quantitative real-time PCR auch der Begriff der kinetischen PCR verwendet.

Initial erfolgt in der PCR die Aktivierung der hitzestabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase. Anschließend tritt die Reaktion in einen Zyklus ein, der in Abhängigkeit des Experimentators und des Herstellers zumeist 30-40-fach durchlaufen wird. Innerhalb eines Zyklus kommt es nach der initialen Denaturierung zur Anlagerung und Hybridisierung des Vorwärts- und Rückwärts-Primers, anschließend erfolgt die Elongation beziehungsweise die Polymerisierung, wodurch die Amplifikationsprodukte letztendlich entstehen. Dabei kann heutzutage eine two-step qRT-PCR von einer one-step qRT-PCR unterschieden

werden. Während bei der two-step qRT-PCR das Primer-Annealing und die Elongation in zwei Schritten und damit in zwei Temperatur-Stufen erfolgt (so genanntes Standard-Protokoll), ist bei der one-step qRT-PCR aufgrund der technischen Weiterentwicklung der Schritt der Primer-Anlagerung und der Polymerisierung zusammengefasst, wodurch nur noch eine Temperatur-Stufe für die beiden Schritte benötigt wird (so genanntes Fast-Protokoll).

Theoretisch beziehungsweise mathematisch ist eine Verdopplung der DNA-Moleküle pro Zyklus und damit eine exponentielle (2^n) Amplifikationsrate möglich. Jedoch kommt es gegen Ende der Reaktion aufgrund der Reduktion der verfügbaren Polymerase-Moleküle durch dessen Bindung an neu synthetisierte Amplifikationsprodukte, aufgrund der partiellen Zerstörung oder Erschöpfung der DNA-Polymerasen und aufgrund des Verbrauches der eingesetzten Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) zunächst zu einer linearen Amplifikations-Charakteristik, die zuletzt in eine terminale Plateau-Phase übergeht. Durch diese Besonderheiten beziehungsweise Einschränkungen lassen sich experimentell lediglich Multiplikationsfaktoren (bezogen auf die Gesamtreaktion) von ungefähr 1,6-1,8 pro Zyklus statt den theoretischen 2^n -fachen Amplifikationsraten erreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden – wie in den Abschnitten **2.1.2 Geräte** und **2.1.4 Enzyme und Kits** beschrieben – das Enzym-Kit SsoFast EvaGreen Supermix sowie der Thermozykler des Modells CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System – beides von der Firma Bio-Rad Laboratories – verwendet, wobei ein Fast-Protokoll im Sinne einer one-step qRT-PCR zum Einsatz kam. Analog zum Hersteller-Protokoll wurde pro Reaktionsansatz ein Gesamtvolumen von 20 µl gewählt, wobei jeweils 1 µl der in Abschnitt **2.3.3 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese** erwähnten verdünnten DNA-Proben Verwendung fand. Die **Tabelle 18** zeigt das Reaktions-Setup eines Ansatzes, wobei jeweils 2 µl der Primer-Paar-Mixe beziehungsweise 2 µl der Bglap QuantiTect-Primer verwendet wurden.

Komponente	Volumen pro Reaktionsansatz
SsoFast EvaGreen Supermix	10 µl
Primer-Paar-Mix (mit einer finalen Konzentration von 0,4 nM je Primer) beziehungsweise Bglap (QuantiTect-Primer; Konzentration unbekannt)	2 µl
DNA-Probe	1 µl
Nuklease-freies Wasser	7 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 18: Volumina zur Herstellung des qRT-PCR-Ansatzes

Gemäß der Hersteller-Angaben und dem Handbuch zum CFX96 Touch Real-Time PCR-Thermozykler entsprechend, wurde das in **Tabelle 19** nachfolgend dargestellte qRT-PCR-Protokoll verwendet.

Optimierte Thermozykler-Konditionen für eine qRT-PCR im CFX96 Real-time PCR-System
1. Schritt: Enzym Aktivierung (95° C, 2 Minuten)
2. Schritt: 30-40 Zyklen mit
a. Denaturierung (95° C, 5 Sekunden)
b. Annealing und Elongation (60°, 5 Sekunden)
c. Schmelzkurve (65-95° C, inkrementell in 0,5° C-Schritten, 5 Sekunden/Schritt)

Tabelle 19: Thermozykler-Protokoll zur qRT-PCR

Die nachfolgenden beiden Abbildungen **Abbildung 16** und **Abbildung 17** zeigen schematisch den Ablauf der qRT-PCR und die Entstehung der Amplifikationsprodukte.

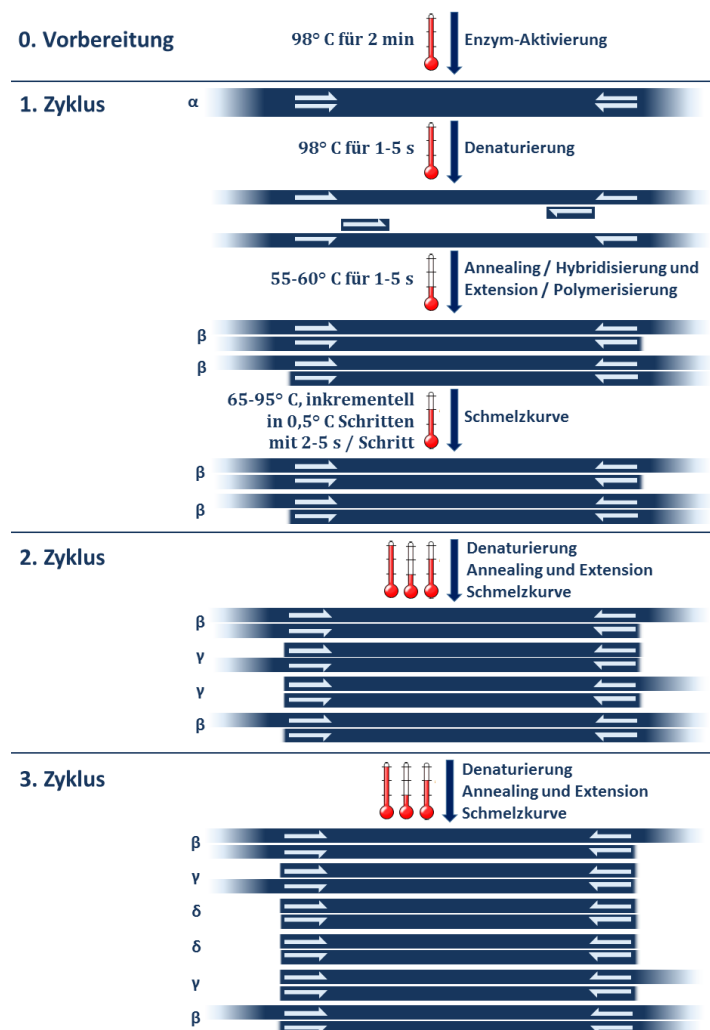


Abbildung 16: Prinzip der quantitativen real-time PCR

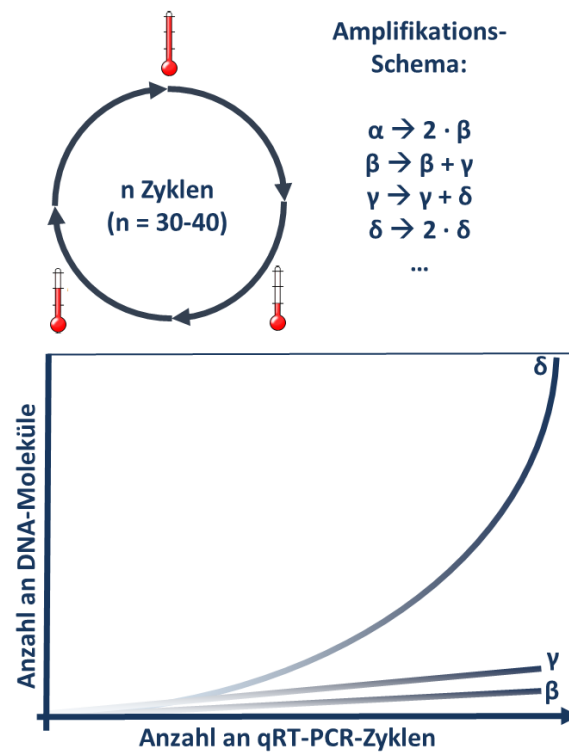


Abbildung 17: Amplifikations-Verlauf der quantitativen real-time PCR

Um eine interne Validierung und Vergleichbarkeit der erhaltenen qRT-PCR-Daten zu ermöglichen und um einer Standardkurve für die relative Quantifizierung der cDNA-Proben zu erhalten, wurden fünfstufige Standardreihen hergestellt. Dabei wurden 2 μ l aller Osteoblasten-, Fibroblasten- und Interface-cDNA-Proben einer jeweiligen Konzentration gepoolt und dieser Standard im Verhältnis 1:10 sukzessive verdünnt, so dass 4 weitere Standardproben mit den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 zum zuvor genannten ersten Standard (1:1) resultieren.

Aus Gründen der Übersicht sind die Zusammensetzungen der Standardreihen im Anhang unter dem Punkt **10.1.3 ID-Liste für die Standardreihen der qRT-PCRs** aufgelistet.

Die genauen Schemata für die verschiedenen qRT-PCR-Analysen sind im Anhang unter **10.1.8 Ergebnisse des PCR-Platten-Designs für die qRT-PCR-Durchführung** angefügt. Auf die Methoden und Verfahren zur Analyse der in den quantitativen real-time PCRs erhaltenen Daten geht das nächste Unterkapitel detailliert ein.

2.4 Software

2.4.1 Software zur statistischen Auswertung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der proprietären Software namens Bio-Rad CFX-Manager in der Version 3.1 (3.1.1517.0823, 32-Bit-Version) des Thermozykler-Herstellers Bio-Rad Laboratories auch das statistische Auswertungs-Paket SPSS von IBM verwendet. Dabei wurde für die Analyse der qRT-PCR-Daten die Version 21 (21.0.0.0, 64-Bit-Version) des IBM SPSS Statistics-Paketes eingesetzt.

Zur Auswertung wurden die im Bio-Rad CFX-Manager erhaltenen, unskalierten Daten exportiert und als Datenmatrix in SPSS importiert. Hinsichtlich der deskriptiven Statistik wurden alle Werte als Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet, wobei zur besseren Interpretation und Vergleichbarkeit der Daten untereinander eine Normalisierung auf die jeweiligen Werte der unstimulierten Kontrolle (0 ng/ml rhBMP7) vom Zeitpunkt Tag 3 stattfand.

Zum Vergleich der unterschiedlichen Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mittels one-way ANOVA in SPSS durchgeführt. Nach der ANOVA fand noch ein Paarvergleich im Sinne von multiplen Testen statt, wobei der Post-Hoc-Test nach Dunnett gewählt wurde. Im Gegensatz zum Tukey-Test, der mehrere Stimulationen gegeneinander vergleicht („all pairs“-Vergleiche, „many-to-many“-Vergleiche), erlaubt der Dunnett-Test den Vergleich mehrerer Stimulationen mit einer Kontrolle („many-to-one“-Vergleiche). Da bei den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchsdurchführungen immer ein unstimulierter Kontroll-Versuch (0 ng/ml rhBMP7) durchgeführt wurde, wurde die Dunnett-Methode im Rahmen der statistischen Auswertung gegenüber dem Tukey-Test bevorzugt und fand daher in der vorliegenden Arbeit ihren Einsatz.

Eine statistische Signifikanz wurde mittels des Signifikanz-Niveaus von $\alpha = 0,05$ festgelegt, wobei innerhalb der statistischen Signifikanz eine weitere Graduierung stattfand, die in der nachfolgenden **Tabelle 20** dargestellt ist.

Signifikanz-Level	Bedeutung
$p < 0,05$ (5%)	Statistisch signifikant
$p < 0,01$ (1%)	Statistisch sehr signifikant
$p < 0,001$ (1‰)	Statistisch hoch-signifikant

Tabelle 20: Übersicht über die verwendeten Signifikanz-Niveaus

2.4.2 Software zur Daten- und Ergebnis-Präsentation

Zur Darstellung, Präsentation und besseren Visualisierung der mittels SPSS Statistics 21 gewonnenen Daten und Ergebnissen wurde für diese Arbeit und ihre zugrundeliegenden Versuchsdurchführungen das Microsoft Office Paket in der Version Standard 2016 (16.0.4498.1000, 64-Bit-Version) verwendet. Dabei wurden die in diesem Produkt enthaltenen Versionen Microsoft Word 2016 (16.0.4498.1000, 64-Bit-Version), Microsoft Excel 2016 (16.0.4498.1000, 64-Bit-Version) und Microsoft PowerPoint 2016 (16.0.4498.1000, 64-Bit-Version) genutzt. Alle in diesem Dokument enthaltenen Tabellen, Abbildungen und Grafiken wurde mit den zuvor genannten Software-Produkten des Microsoft Office Paketes erstellt.

2.5 Mikroskopie

Neben der Analyse der Transkriptom-Veränderungen der Osteoblasten und der Fibroblasten mittels quantitativer real-time PCR wurden auch mikroskopische Untersuchungen zur Überprüfung der Zellen, des Zellwachstums und des Migrationsverhaltens im Interface-Bereich durchgeführt. Dazu wurden, wie in Unterkapitel **2.1.2 Geräte** beschrieben, das Durchlichtmikroskopie Laborlux S und das inverse Labormikroskop Leica DM IL LED mit dem digitalen Kamerasystem Leica EC3 eingesetzt.

Es wurden mehrere Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-Systeme – wie in den Abschnitten **2.2.4 Vorbereitung der Co-Kultivierung** und **2.2.5 Co-Kultivierung und rhBMP7-Stimulation** beschrieben – vorbereitet und mit rhBMP7 zu den vordefinierten Zeitpunkten am Tag 0 für die singuläre Stimulation und an den Tagen 0, 3 und 7 im Rahmen der multiplen rhBMP7-Applikation behandelt. Zur besseren Kontrolle wurden für die mikroskopischen Untersuchungen zwei biologische Replikate pro Probe angelegt, weiterhin wurden für die singulären und multiplen rhBMP7-Stimulationen lediglich die höchsten Konzentrationen von 500 ng/ml rhBMP7 verwendet.

Die im Anhang dargestellte **10.1.4 ID-Liste für die mikroskopischen Untersuchungen** zeigt die Übersicht über die in der Mikroskopie eingesetzten Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-Systeme.

Zur semi-quantitativen Bestimmung der Interface-Fläche in den Kontrollbeziehungsweise in den Stimations-Durchführungen und zu den oben genannten Zeitpunkten wurde das plattformübergreifende Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm ImageJ auf Open Source-Software-Basis in der Version 1.51o (64-Bit-Version) verwendet.

Nachdem in diesem Kapitel detailliert und vollständig sowohl die verwendeten Geräte, Chemikalien, Lösungen, Kits und Software-Pakete als auch die dieser Arbeit zugrundeliegenden Zellkultur-Techniken und molekularbiologischen sowie mikroskopischen Methoden beschrieben wurden, geht das nachfolgende Kapitel **3. Ergebnisse** ausführlich auf die detaillierten Resultate der Untersuchungen ein.

3. Ergebnisse

Dieses Kapitel geht ausführlich auf die Ergebnisse der quantitativen real-time PCRs für die Differenzierungs-Marker und die Gene der extrazellulären Matrix ein. Dabei widmen sich die nachfolgenden Unterkapitel den Expressionsleveln der einzelnen untersuchten Gene im Osteoblasten-, Interface- und Fibroblasten-Bereich und beschreiben sowohl die Ergebnisse nach singulärer rhBMP7-Applikation als auch nach multipler rhBMP7-Stimulation. Die Reihenfolge der Unterkapitel richtet sich nach dem chronologischen Auftreten jedes Gens während der Osteoblasten-Differenzierung beziehungsweise entsprechend der zeitlichen Abfolge der osteogenen Reifung (siehe hierzu auch das Unterkapitel **1.6.3 Studien-Aufbau und konzeptionelle Versuchsplanung**). Dabei wird jeweils zuerst auf die Veränderungen der Genexpression nach singulärer rhBMP7-Stimulation und anschließend auf die Resultate der Expressionslevel bei multipler rhBMP7-Applikation eingegangen.

Zur Veranschaulichung der Daten sind die Ergebnisse der quantitativen real-time PCRs in Form von Diagrammen dargestellt beziehungsweise visualisiert. Die exakten Genexpressionswerte finden sich aus Gründen der Übersichtlichkeit in den im Anhang aufgeführten Tabellen, siehe diesbezüglich die Punkte **10.1.10 Ergebnisse der qRT-PCR in Rohform**, **10.1.11 Ergebnisse der Signifikanz-Analyse der bereichsabhängigen qRT-PCRs**, **10.1.12 Ergebnisse der Signifikanz-Analyse der zeitabhängigen qRT-PCRs** und **10.1.13 Ergebnisse der Signifikanz-Analyse der dosisabhängigen qRT-PCRs**.

Weiterhin zeigen die nachfolgend dargestellten Abbildungen die statistischen Signifikanzen in Form von Signifikanz-Balken im oberen Diagrammflächen-Bereich, wobei die Analyse auf drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$) beruht. Wie in **2.4.1 Software zur statistischen Auswertung** beschrieben beziehungsweise wie in **Tabelle 20** dargestellt wird eine dreistufige Graduierung der Signifikanz vorgenommen. Ein Stern (*) stellt ein signifikantes Ergebnis mit dem Signifikanz-Niveau – entspricht der oberen Grenze für die Irrtumswahrscheinlichkeit – von $p < 0,05$ (5%) dar, wohingegen zwei Sterne (**) ein so genanntes sehr signifikantes Ergebnis mit dem Signifikanz-Niveau $p < 0,01$ (1%) kennzeichnen. Mit drei Sternen (***) werden so genannte hoch-signifikante Ergebnisse mit dem Signifikanz-Niveau $p < 0,001$ (1‰) charakterisiert beziehungsweise kenntlich gemacht.

Die zugrundeliegenden Signifikanz-Daten sind in den Signifikanz-Tabellen für die bereichsabhängigen, zeitabhängigen und dosisabhängigen qRT-PCR-Ergebnissen aufgelistet, welche sich aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in diesem Kapitel sondern

im Anhang unter **10.1.14 Ergebnisse der Genexpressionslevel-Analyse für die bereichsabhängigen qRT-PCRs** und **10.1.15 Ergebnisse der Genexpressionslevel-Analyse für die zeitabhängigen qRT-PCRs** sowie **10.1.16 Ergebnisse der Genexpressionslevel-Analyse für die dosisabhängigen qRT-PCRs** wiederfinden.

Bezüglich der grafischen Darstellungen werden die in der nachfolgenden **Tabelle 21** aufgezählten drei Typen unterschieden.

Grafik-Typ	Dargestellter Inhalt
Bereichsabhängige Grafik	Dient der Darstellung und dem Vergleich der Veränderungen in den einzelnen Bereichen (Osteoblasten-, Fibroblasten- und Interface-Bereich)
Dosisabhängige Grafik	Dient der Darstellung und dem Vergleich der Veränderungen nach Stimulation mit den einzelnen rhBMP7-Dosen (0 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml)
Zeitabhängige Grafik	Dient der Darstellung und dem Vergleich der Veränderungen nach den definierten Zeitpunkten (Tag 3, Tag 7, Tag 10)

Tabelle 21: Übersicht über die verwendeten Grafik-Typen

Während die ersten und zweiten Zeilen jeder Grafik die bereichsabhängigen Veränderungen nach singulärer und multipler rhBMP7-Zugabe zeigen, sind in den dritten und vierten Zeilen jedes Diagrammes die zeitabhängigen Genexpressionen für die einfacher und mehrfache rhBMP7-Stimulation dargestellt. In den fünften und sechsten Zeilen in jeder Abbildung finden sich die dosisabhängigen Expressionswerte der singulären und multiplen rhBMP7-Applikation samt Signifikanz-Werten.

Alle Werte in den Grafiken wurden auf den Kontrollwert 0 ng/ml an Tag 3 der jeweiligen singulären oder multiplen rhBMP7-Stimulationsversuchsreihe normalisiert.

Das letzte Unterkapitel geht auf die mikroskopischen und histologischen Veränderungen in den drei Zonen des Co-Kultur-Modells ein. Hier werden im Allgemeinen das Wachstumsverhalten der beteiligten Zelllinien und im Speziellen die Migration der Osteoblasten und Fibroblasten in die Kontakt-Zone analysiert.

3.1 Die Runx2-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Nachfolgend wird auf die Runx2-Genexpression nach singulärer und nach multipler rhBMP7-Stimulation eingegangen, wobei abschnittsweise die bereichsabhängigen, die zeitabhängigen und die dosisabhängigen Veränderungen grafisch dargestellt und beschrieben werden.

3.1.1 Die bereichsabhängige Runx2-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

In der **Abbildung 18** sind die Auswirkungen der singulären respektive multiplen rhBMP7-Stimulation auf die Runx2-Genexpression in den einzelnen Versuchs-Bereichen dargestellt, wobei jeweils die oberen Grafiken den Osteoblasten-Bereich, die mittleren Grafiken den Interface-Bereich und die unteren Grafiken den Fibroblasten-Bereich zeigt.

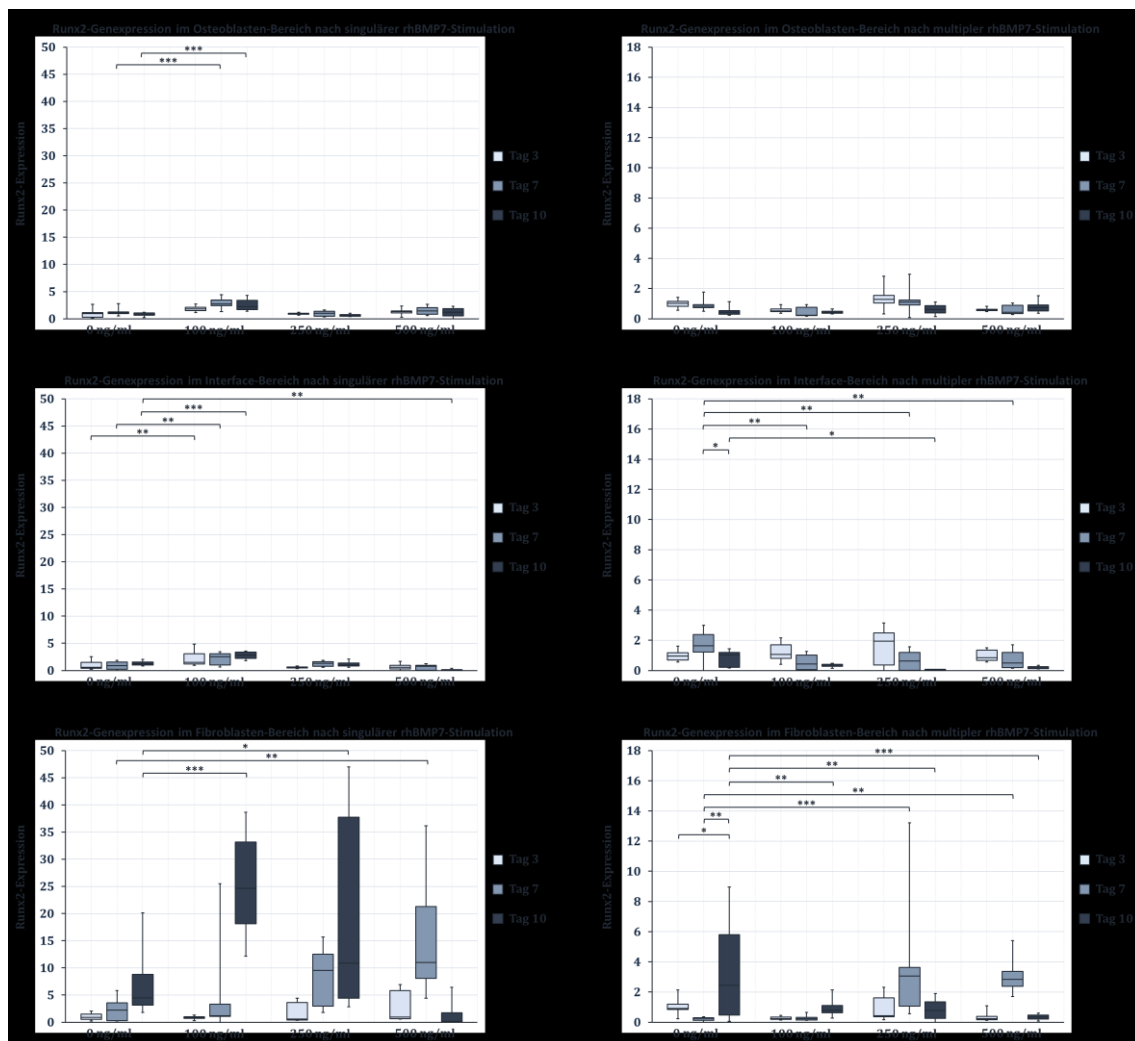


Abbildung 18: Bereichsabhängige Runx2-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation (n = 3)

Im Osteoblasten-Bereich kam es nach singulärer rhBMP7-Applikation in der Konzentration von 100 ng/ml nach 7 Tagen beziehungsweise 10 Tagen zu einer hoch-signifikanten Erhöhung der Runx2-Expression von 1,09 auf 2,72 am 7. Tag (\approx 2,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) beziehungsweise 0,76 auf 2,21 am 10. Tag (\approx 3,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Für die multiple rhBMP7-Applikation im Osteoblasten-Bereich zeigten sich keine signifikanten Änderungen.

Im Interface-Bereich zeigten sich mehrere signifikante Veränderungen nach singulärer rhBMP7-Zugabe. So kam es für die Konzentration von 100 ng/ml nach 3 Tagen zu einer sehr signifikanten Erhöhung der Runx2-Expression von 0,60 auf 1,52 (\approx 2,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), nach 7 Tagen zu einem sehr signifikanten Genexpressionsanstieg von 0,87 auf 2,52 (\approx 2,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und nach 10 Tagen zu einer hoch-signifikanten Erhöhung von 1,25 auf 2,81 (\approx 2,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Weiterhin zeigte sich für die Konzentration 500 ng/ml nach 10 Tagen eine sehr signifikante Erniedrigung der Runx2-Genexpression von 1,25 auf 0,08 (\approx 15,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Bezüglich der mehrfachen rhBMP7-Applikation im Interface-Bereich zeigten sich für die unterschiedlichen Konzentrationen zum Zeitpunkt nach 7 Tagen signifikant erniedrigte Runx2-Expressionswerte. So ergab sich für die Konzentration 100 ng/ml nach 7 Tagen eine sehr signifikante Genexpressionsreduktion von 1,63 auf 0,44 (\approx 3,7-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag), für die Konzentration 250 ng/ml eine sehr signifikante Erniedrigung von 1,63 auf 0,62 (\approx 2,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und für die Konzentration 500 ng/ml eine sehr signifikante Abnahme der Runx2-Expression von 1,63 auf 0,51 (\approx 3,2-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag).

Auch die unstimulierte Kontrolle nach 7 Tagen zeigte eine signifikante Expressionserniedrigung von 1,63 auf 1,03 (\approx 1,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Für die Konzentration von 250 ng/ml ergab sich nach 10 Tagen eine signifikante Reduktion der Runx2-Genexpression von 1,03 auf 0,02 (\approx 51,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Für den Bereich der Fibroblasten zeigten sich nach singulärer Hinzugabe von rhBMP7 Erhöhungen der Runx2-Genexpressionswerte. Am 7. Tag ließ sich für die Konzentration von

500 ng/ml eine sehr signifikante Runx2-Expressionserhöhung von 2,20 auf 11,00 (\approx 5,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) nachweisen. Ebenfalls resultierte für die Konzentrationen von 100 ng/ml beziehungsweise 250 ng/ml nach 10 Tagen hochsignifikante Expressionsanstiege von einerseits 4,46 auf 24,64 (\approx 5,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für 100 ng/ml und andererseits von 4,46 auf 10,86 (\approx 2,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für 250 ng/ml.

Nach multipler rhBMP7-Applikation zeigten sich analog zum singulären Stimulationsansatz erhöhte Runx2-Genexpressionen. Für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag ergab sich einerseits eine signifikante Erhöhung von 0,91 auf 2,45 (\approx 2,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits ein sehr signifikanter Genexpressionsanstieg von 0,25 auf 2,45 (\approx 9,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Darüber hinaus kam es am 7. Tag zu einer hochsignifikanten Erhöhung für die Dosierung von 250 ng/ml von 0,25 auf 3,05 (\approx 12,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) beziehungsweise für die Konzentration von 500 ng/ml zu einem sehr signifikanten Expressionsanstieg von 0,25 auf 2,84 (\approx 11,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Weiterhin zeigten sich nach 10 Tagen der Versuchsdurchführungen erniedrigte Runx2-Genexpressionslevel. So resultierte ein sehr signifikanter Runx2-Expressionsabfall von 2,45 auf 0,79 (\approx 3,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für die Konzentration von 100 ng/ml beziehungsweise von 2,45 auf 0,78 (\approx 3,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für die Konzentration 250 ng/ml. Für die Konzentration 500 ng/ml ergab sich eine hochsignifikante Expressionsreduktion von 2,45 auf 0,34 (\approx 7,2-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

3.1.2 Die zeitabhängige Runx2-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

In der **Abbildung 19** sind die Auswirkungen der singulären respektive multiplen rhBMP7-Stimulation auf die Runx2-Genexpression zu den unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt, wobei die jeweils oberen Grafiken die Genexpression nach 3 Tagen, die mittleren Grafik die Genexpression nach 7 Tagen und die unteren Grafik die Runx2-Genexpression nach 10 Tagen zeigt.

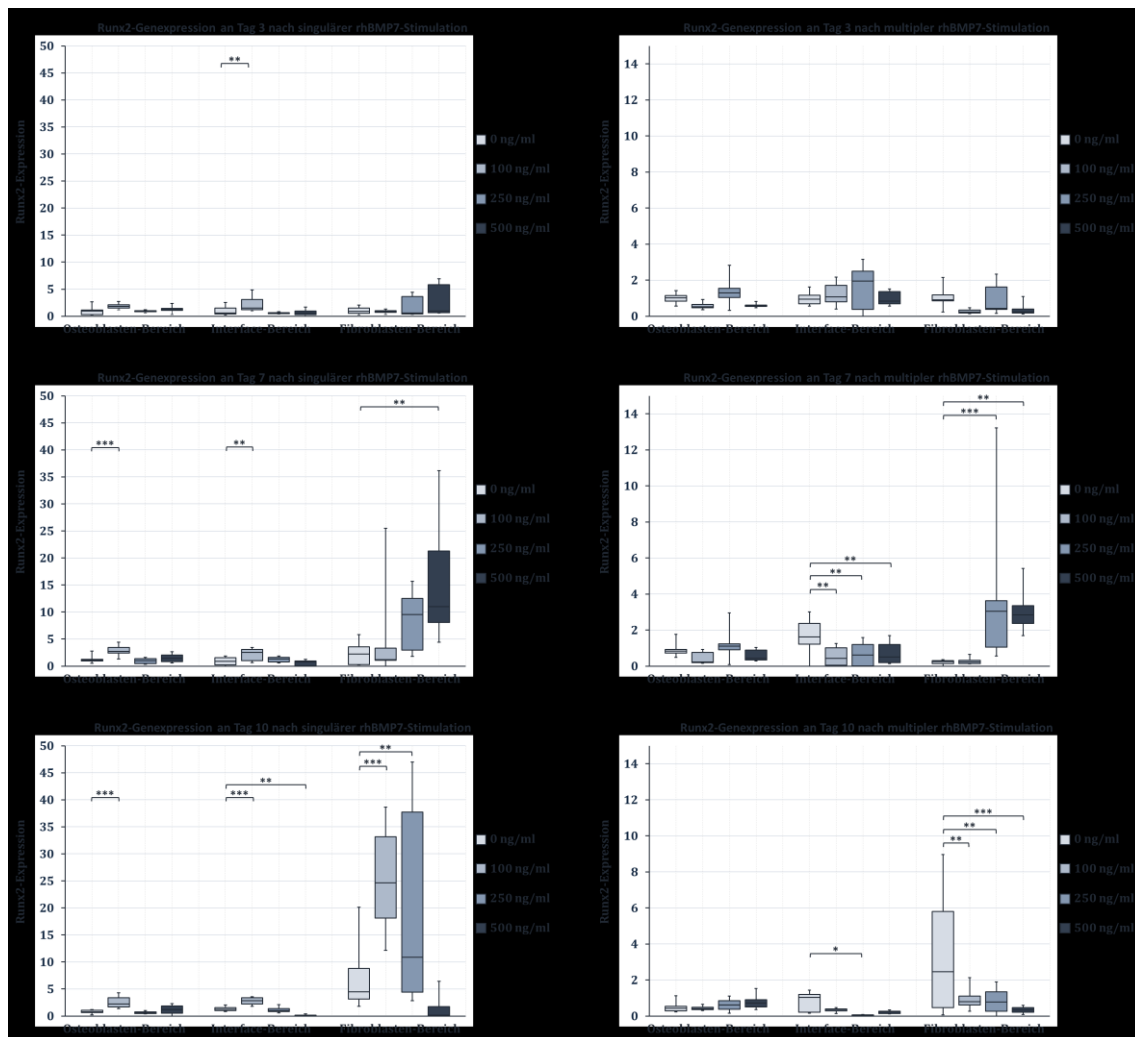


Abbildung 19: Zeitabhängige Runx2-Genexpression nach singularer und multipler rhBMP7-Stimulation (n = 3)

Nach singularer rhBMP7-Applikation zeigte sich am 3. Tag lediglich im Interface-Bereich und für die Konzentration von 100 ng/ml eine sehr signifikante Erhöhung von 0,60 auf 1,52 ($\approx 2,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Für den Osteoblasten- und Fibroblasten-Bereich ergaben sich keine signifikanten Expressionsanstiege oder -abnahmen.

Auch in dem Ansatz mit multiplen rhBMP7-Stimulationen ließen sich weder im Osteoblasten-, noch im Interface- oder Fibroblasten-Bereich signifikante Veränderungen bezüglich der Runx2-Genexpression nachweisen.

Am 7. Tag der singularen rhBMP7-Stimulation zeigte sich im Osteoblasten-Bereich ein hoch-signifikanter Runx2-Expressionsanstieg für die Konzentration 100 ng/ml von 1,09 auf 2,72 ($\approx 2,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Darüber hinaus resultierten am 7. Tag im Interface-Bereich ein sehr signifikanter Zuwachs der Genexpression für die Konzentration mit 100 ng/ml von 0,87 auf 2,52 ($\approx 2,9$ -fache

Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und zudem ein sehr signifikanter Expressionsprogress im Fibroblasten-Bereich für die Dosierung 500 ng/ml ein von 2,20 auf 11,0 (\approx 5,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag).

Bezüglich der multiplen rhBMP7-Stimulation zeigten sich im Osteoblasten-Bereich am 7. Tag keine Änderungen, jedoch im Interface-Bereich und im Fibroblasten-Bereich. Während es im Interface-Bereich zur Reduktion der Runx2-Genexpression kam, ergab sich für den Fibroblasten-Bereich der Nachweis einer Genlevel-Steigerung. Genauer genommen zeigten sich im Interface-Bereich für die Konzentrationen von 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml jeweils sehr signifikante Expressionslevelreduktionen von 1,63 auf 0,44 (\approx 3,7-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für 100 ng/ml, von 1,63 auf 0,62 (\approx 2,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für 250 ng/ml und von 1,63 auf 0,51 (\approx 3,2-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für 500 ng/ml. Umgekehrt ließ sich im Fibroblasten-Bereich eine Induktion der Genexpression nachweisen, so dass sich hier eine hoch-signifikante Steigerung von 0,25 auf 3,05 (\approx 12,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für die Dosierung von 250 ng/ml und eine sehr signifikante Steigerung von 0,25 auf 2,84 (\approx 11,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für die Konzentration von 500 ng/ml ergab.

Mehrere signifikante Runx2-Genexpressionsänderungen ließen sich für die singuläre rhBMP7-Applikation nach 10 Tagen und für alle untersuchten Bereichen nachweisen. Im Osteoblasten-Bereich zeigte sich am 10. Tag für die Konzentration 100 ng/ml ein hoch-signifikanter Anstieg der Runx2-Genexpression von 0,76 auf 2,21 (\approx 2,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Für die Konzentration von 100 ng/ml resultierte im Interface-Bereich eine hoch-signifikante Expressionserhöhung von 1,25 auf 2,81 (\approx 2,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag), wohingegen sich für die Dosierung von 500 ng/ml eine sehr signifikante Erniedrigung der Runx2-Genexpression von 1,25 auf 0,08 (\approx 15,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) zeigte. Im Fibroblasten-Bereich ergaben sich für die Konzentrationen von 100 ng/ml beziehungsweise 250 ng/ml am 10. Tag der Versuche signifikante Erhöhungen der Runx2-Expression. Hier zeigten sich für die Konzentration von 100 ng/ml eine hoch-signifikante Erhöhung von 4,46 auf 24,64 (\approx 5,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die Konzentration von 250 ng/ml eine Steigerung von 4,46 auf 10,86 (\approx 2,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Hinsichtlich der multiplen rhBMP7-Stimulation ergaben sich am Zeitpunkt nach 10 Tagen analog zur den Ergebnissen nach 7 Tagen keine Veränderungen im Osteoblasten-Bereich, jedoch signifikante Befunde im Interface- und Fibroblasten-Bereich. Eine signifikante Erniedrigung der Runx2-Expression von 1,03 auf 0,02 (\approx 51,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) zeigte sich im Interface-Bereich für die Konzentration 250 ng/ml. Im Fibroblasten-Bereich ließen sich für alle Konzentrationen am 10. Tag der multiplen Stimulation erniedrigte Runx2-Expressionswerte nachweisen. So kam es für die Konzentration von 100 ng/ml zu einer Expressionsreduktion von 2,45 auf 0,79 (\approx 3,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag), für die Dosierung von 250 ng/ml zur Verminderung von 2,45 auf 0,78 (\approx 3,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für 500 ng/ml zur Runx2-Expressionsregression von 2,45 auf 0,34 (\approx 7,2-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

3.1.3 Die dosisabhängige Runx2-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Die Grafiken der **Abbildung 20** stellt die dosisabhängigen Auswirkungen der einfachen und mehrfachen rhBMP7-Applikation auf die Expressionslevel von Runx2 dar, wobei die oberen Grafiken die Ergebnisse für die Konzentration von 100 ng/ml rhBMP7, die mittleren Grafiken die Resultate für die rhBMP7-Konzentration von 250 ng/ml und die unteren Grafiken die Befunde für die Konzentration von 500 ng/ml rhBMP7 widerspiegelt.

Es zeigten sich sowohl für die singuläre als auch für die multiple rhBMP7-Stimulation für die Konzentration von 100 ng/ml zahlreiche signifikante Runx2-Expressions-Veränderungen. In der singulären Stimulation mit 100 ng/ml kam es im Osteoblasten-Bereich am 7. Tag zu einer hoch-signifikanten Runx2-Steigerung von 0,96 auf 2,72 (\approx 2,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise von 1,09 auf 2,72 (\approx 2,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Weiterhin zeigte sich für die 100 ng/ml-Dosierung im besagten Osteoblasten-Bereich eine hoch-signifikante Steigerung am 10. Tag von 0,96 auf 2,21 (\approx 2,3-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise eine hoch-signifikante Erhöhung von 1,09 auf 2,21 (\approx 2,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) respektive von 0,76 auf 2,21 (\approx 2,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Im Interface-Bereich kam es für die Konzentration von 100 ng/ml einerseits am 3. Tag zu einer sehr signifikanten Runx2-Expressionssteigerung von 0,60 auf 1,52 (\approx 2,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur

unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits am 7. Tag ebenfalls zu einer sehr signifikanten Erhöhung der Genexpression von 0,60 auf 2,52 ($\approx 4,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) beziehungsweise von 0,87 auf 2,52 ($\approx 2,9$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Am 10. Tag der singulären Stimulation ergaben sich für die 100 ng/ml-Dosierung hoch-signifikante Runx2-
Erhöhungen von 0,60 auf 2,81 ($\approx 4,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), von 0,81 auf 2,81 ($\approx 3,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) respektive von 1,25 auf 2,81 ($\approx 2,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Bezüglich des Fibroblasten-Bereiches zeigte sich für die 100 ng/ml-Stimulation mit rhBMP7 eine hoch-signifikante Steigerung des Runx2-Genexpressionslevel von 0,88 auf 24,64 ($\approx 28,0$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), von 2,20 auf 24,64 ($\approx 11,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) beziehungsweise von 4,46 auf 24,64 ($\approx 5,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

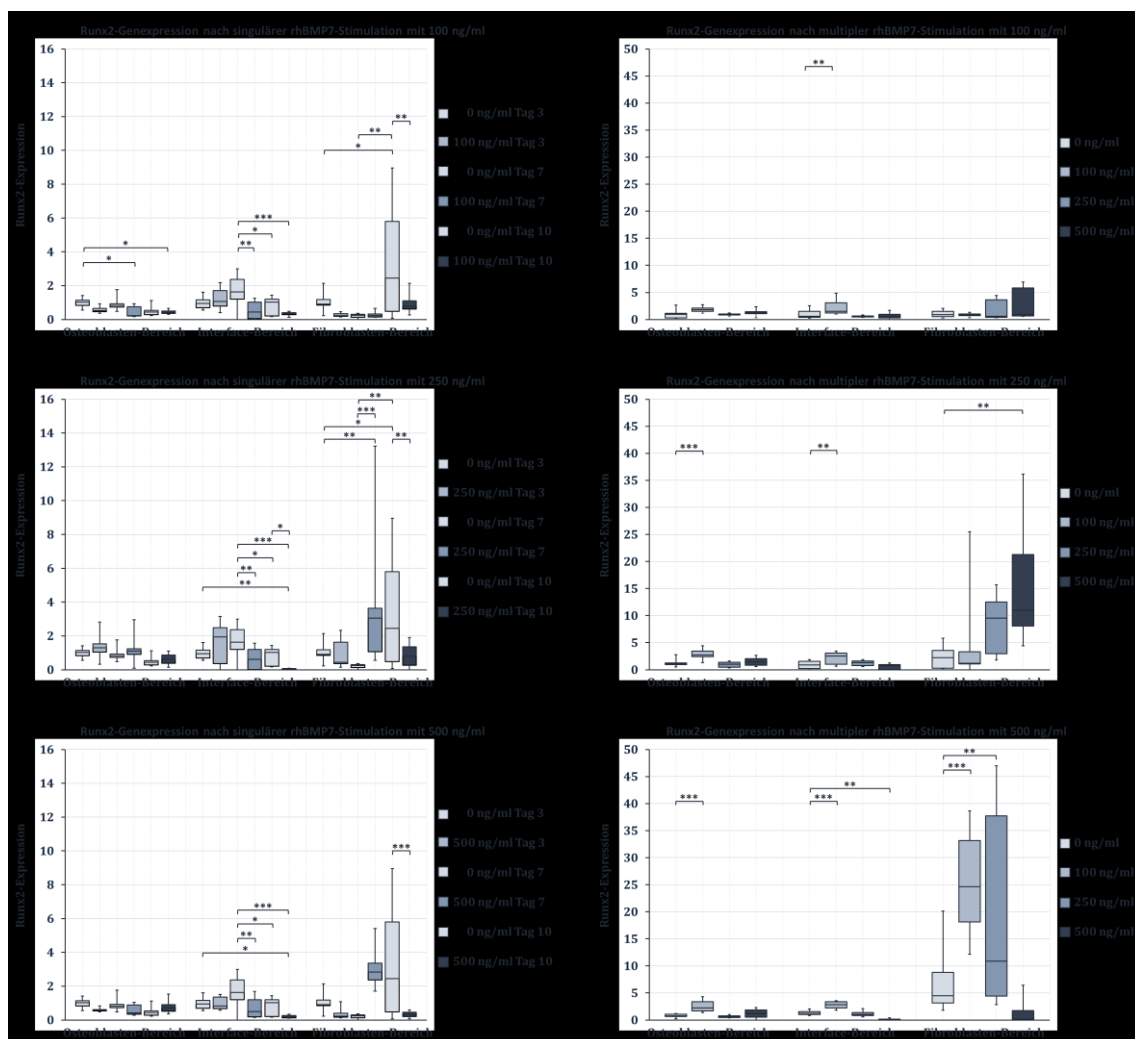


Abbildung 20: Dosisabhängige Runx2-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation (n = 3)

Im multiplen rhBMP7-Stimulationsversuch resultierte für die Dosierung von 100 ng/ml rhBMP7 eine signifikante Runx2-Expressionserniedrigung am 7. Tag von 1,02 auf 0,23 (\approx 4,4-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) sowie am 10. Tag von 1,02 auf 0,40 (\approx 2,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Im Interface-Bereich ließ sich für die Konzentration von 100 ng/ml eine sehr signifikante Expressionsreduktion von Runx2 am 7. Tag von 1,63 auf 0,44 (\approx 3,7-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und eine hoch-signifikante Verminderung am 10. Tag von 1,63 auf 0,36 (\approx 4,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) nachweisen. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Reduktion der unstimulierten Kontrolle am 10. Tag von 1,63 auf 1,03 (\approx 1,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Im Fibroblasten-Bereich konnte für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag ein signifikanter Runx2-Expressionsanstieg von 0,91 auf 2,45 (\approx 2,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) respektive eine sehr signifikante Erhöhung von 0,25 auf 2,45 (\approx 9,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) beobachtet werden. Demgegenüber stand eine sehr signifikante Expressionsverminderung für die Konzentration von 100 mg/ml am 10. Tag von 2,45 auf 0,79 (\approx 3,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Bei der singulären rhBMP7-Stimulation mit 250 ng/ml zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im Osteoblasten- oder Interface-Bereich, lediglich im Fibroblasten-Bereich ergaben sich signifikante Resultate. Für die Dosierung von 250 ng/ml resultierte nach 10 Tagen im Fibroblasten-Bereich eine hoch-signifikante Erhöhung von 0,88 auf 10,86 (\approx 12,3-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise von 2,20 auf 10,86 (\approx 4,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) sowie ein signifikanter Runx2-Genexpressionsanstieg von 4,46 auf 10,86 (\approx 2,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Analog zur singulären rhBMP7-Stimulation mit einer Konzentration von 250 ng/ml ergaben sich bei multipler Substitution von rhBMP7 im Osteoblasten-Bereich keine veränderten Runx2-Expressionslevel, wohingegen signifikante Expressionsalternationen im Fibroblasten-Bereich und im Interface-Bereich zu verzeichnen waren. Im Interface-Bereich zeigten sich für die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP7 am 7. Tag eine sehr signifikante Runx2-Reduktion von 1,63 auf 0,62 (\approx 2,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und am 10. Tag eine sehr signifikante Expressionsverminderung von 0,95 auf 0,02 (\approx 47,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), von 1,63 auf 0,02 (\approx 81,5-fache Erniedrigung, im

Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) beziehungsweise von 1,03 auf 0,02 (\approx 51,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Weiterhin kam es im Interface-Bereich bei einer Stimulations-Dosierung von 250 ng/ml rhBMP7 zu einer signifikanten Runx2-Expressionsreduktion für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag von 1,63 auf 1,03 (\approx 1,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Für den Fibroblasten-Bereich ergab sich bei multipler Zugabe von 250 ng/ml rhBMP7 am 7. Tag eine sehr signifikante Runx2-Expression von 0,91 auf 3,05 (\approx 3,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise eine hoch-signifikante Erhöhung der Expression von 0,25 auf 3,05 (\approx 12,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Weiterhin zeigte sich eine signifikante Runx2-Steigerung für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag von 0,91 auf 2,45 (\approx 2,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise eine sehr signifikante Erhöhung für besagte Kontrolle von 0,25 auf 2,45 (\approx 9,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Zuletzt ergab sich für die Konzentration von 250 ng/ml am 10. Tag im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt eine sehr signifikante Runx2-Genexpressionsreduktion von 2,45 auf 0,78 (\approx 3,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Hinsichtlich der singulären Stimulation mit 500 ng/ml rhBMP7 ergaben sich im Osteoblasten-Bereich keine signifikanten Änderungen der Runx2-Expression, wohingegen im Interface-Bereich nach 10 Tagen eine sehr signifikante Reduktion des Runx2-Levels von 1,25 auf 0,08 (\approx 15,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) zu verzeichnen war. Im Fibroblasten-Bereich kam es am 7. Tag der Versuchsdurchführungen zu einer sehr signifikanten Zunahme der Runx2-Expression von 0,88 auf 11,00 (\approx 12,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise von 2,20 auf 11,00 (\approx 5,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag).

Im multiplen Stimulationsansatz mit 500 ng/ml zeigten sich bezüglich des Runx2-Expressionslevels analog zur singulären rhBMP7-Applikation keine signifikanten Levelveränderungen im Osteoblasten-Bereich. Im Fibroblasten-Bereich resultierte eine hoch-signifikante Reduktion der Runx2-Expression bei multipler rhBMP7-Zugabe in einer Konzentration von 500 ng/ml von 2,45 auf 0,34 (\approx 7,2-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). In ähnlicher Weise kam es im Fibroblasten-Bereich zu signifikanten Reduktionen der Runx2-Expression. Hier zeigte sich am 7. Tag eine sehr signifikante Runx2-Verminderung von 1,63 auf 0,51 (\approx 3,2-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) sowie eine Expressionslevelrückgang für die

unstimulierte Kontrolle am 10. Tag von 1,63 auf 1,03 (\approx 1,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Weiterhin ergab sich eine signifikante Runx2-Regression am 10. Tag nach multipler Stimulation mit 500 ng/ml rhBMP7 von 0,95 auf 0,23 (\approx 4,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise eine hoch-signifikante Reduktion besagter Runx2-Genexpression nach 10 Tagen von 1,63 auf 0,23 (\approx 7,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag).

3.2 Die Col1a1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Die Col1a1-Genexpressionen nach singulärer respektive multipler Stimulation sind in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben, wobei – wie bereits aus der Analyse der Runx2-Genexpression bekannt – eine Gliederung in eine bereichsabhängige, eine zeitabhängige und eine dosisabhängige Betrachtung vorgenommen wird.

3.2.1 Die bereichsabhängige Col1a1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Die **Abbildung 21** visualisiert die Auswirkungen der einfachen beziehungsweise mehrfachen rhBMP7-Substitution auf die Col1a1-Genexpression in den experimentell unterschiedenen Bereichen. Dabei zeigen die jeweils oberen Grafiken die Änderungen der Col1a1-Expression im Osteoblasten-, die mittig angeordneten Grafiken die Änderungen im Interface-Bereich und die unteren Grafiken die Befunde im Fibroblasten-Bereich.

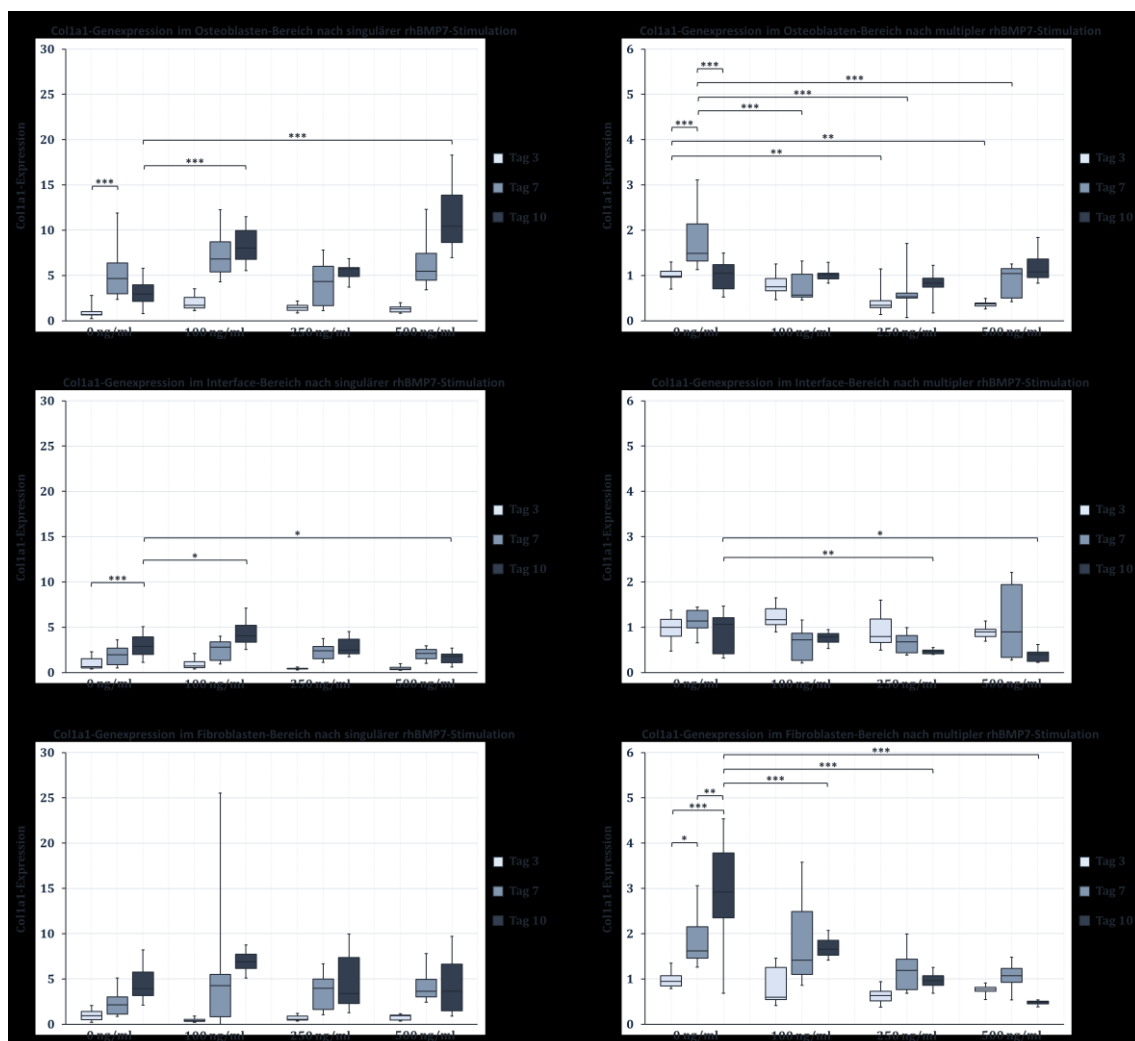


Abbildung 21: Bereichsabhängige Col1a1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation (n = 3)

Im Osteoblasten-Bereich zeigte sich für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag nach singulärer rhBMP7-Substitution ein hoch-signifikanter Anstieg der Col1a1-Genexpression von 0,67 auf 4,86 ($\approx 7,3$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Am 10. Tag kam es für die Konzentrationen von 100 ng/ml respektive 500 ng/ml rhBMP7 zu hoch-signifikanten Erhöhungen von 2,95 auf 8,03 ($\approx 2,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) beziehungsweise von 2,95 auf 10,42 ($\approx 3,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Hinsichtlich der Col1a1-Expression bei multipler rhBMP7-Stimulation zeigten sich im Osteoblasten-Bereich zahlreiche signifikante Reduktionen. Für die Konzentrationen von 250 ng/ml respektive von 500 ng/ml resultierten am 3. Tag sehr signifikante Expressionsverminderungen von 0,98 auf 0,34 ($\approx 2,9$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise von 0,98 auf 0,37 ($\approx 2,6$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Während sich für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag eine hoch-signifikante Col1a1-Erhöhung von 0,98 auf 1,49 ($\approx 1,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) ergab, zeigte sich für die unstimulierte Kontrolle an Tag 10 eine hoch-signifikante Verminderung der Genexpression von 1,49 auf 1,05 ($\approx 1,4$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Weiterhin ließen sich im Osteoblasten-Bereich für die Konzentrationen 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml am 7. Tag der multiplen rhBMP7-Stimulation hoch-signifikante Reduktionen der Col1a1-Expressionslevel von 1,49 auf 0,56 ($\approx 2,7$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für die 100 ng/ml-Dosierung, 1,49 auf 0,53 ($\approx 2,8$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für die Konzentration von 250 ng/ml und 1,49 auf 1,04 ($\approx 1,4$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für eine rhBMP7-Konzentration von 500 ng/ml beobachten.

Für den Interface-Bereich ergab sich nach singulärer rhBMP7-Stimulation eine hoch-signifikante Erhöhung der Col1a1-Genexpression der unstimulierten Kontrolle nach 7 Tagen von 0,64 auf 2,87 ($\approx 4,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Darüber hinaus zeigten sich für 100 ng/ml und für 500 ng/ml singuläre rhBMP7-Applikation am 10. Tag signifikante Expressionsveränderungen. Hier kam es genauer gesagt zu einer signifikanten Erhöhung von 2,87 auf 4,05 ($\approx 1,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für 100 ng/ml und zu einer signifikanten Reduktion von 2,87 auf 1,78 ($\approx 1,5$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für 500 ng/ml.

Für die multiple Stimulation resultierte im Interface-Bereich nach 10 Tagen eine sehr signifikante Col1a1-Expressionsverminderung für die Konzentration von 250 ng/ml von 1,07 auf 0,46 (\approx 2,3-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) sowie eine signifikante Erniedrigung für die Konzentration von 500 ng/ml von 1,07 auf 0,40 (\approx 2,7-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Für die singuläre rhBMP7-Stimulation ergaben sich im Fibroblasten-Bereich hinsichtlich der Expressionslevel von Col1a1 keine signifikanten Modifikationen, jedoch zeigten sich mehrere Genexpressionsänderungen nach multipler Applikation von rhBMP7.

So konnte für die unstimulierte Kontrolle im Fibroblasten-Bereich am 7. Tag bei der mehrfachen rhBMP7-Substitution eine signifikante Erhöhung der Col1a1-Expression von 0,95 auf 1,62 (\approx 1,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) nachgewiesen werden. Die unstimulierte Kontrolle am Zeitpunkt 10 Tage ergab eine hoch-signifikante Expressionssteigerung von 0,95 auf 2,92 (\approx 3,1-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise eine sehr signifikante Col1a1-Levelerhöhung von 1,62 auf 2,92 (\approx 1,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Für die Konzentrationen von 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml zeigten sich nach multipler Stimulation hoch-signifikante Expressionsabnahmen nach 10 Tagen, präziser formuliert eine Reduktion von 2,92 auf 1,66 (\approx 1,8-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für 100 ng/ml, von 2,92 auf 0,96 (\approx 3,0-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für 250 ng/ml und von 2,92 auf 0,48 (\approx 6,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für 500 ng/ml multipler rhBMP7-Substitution.

3.2.2 Die zeitabhängige Col1a1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

In der **Abbildung 22** sind die Col1a1-Genexpression zu den unterschiedlichen Zeitpunkten und bezüglich der einfachen respektive mehrfachen rhBMP7-Stimulation gezeigt. Dabei stellen die oben angeordneten beiden Grafiken die Col1a1-Genexpression nach 3 Tagen, die mittig angeordneten beiden Grafiken die Col1a1-Genexpressionlevel nach 7 Tagen und die unten angeordneten beiden Grafik die Col1a1-Expressionsniveaus am 10. Tag der Versuchsdurchführungen dar.

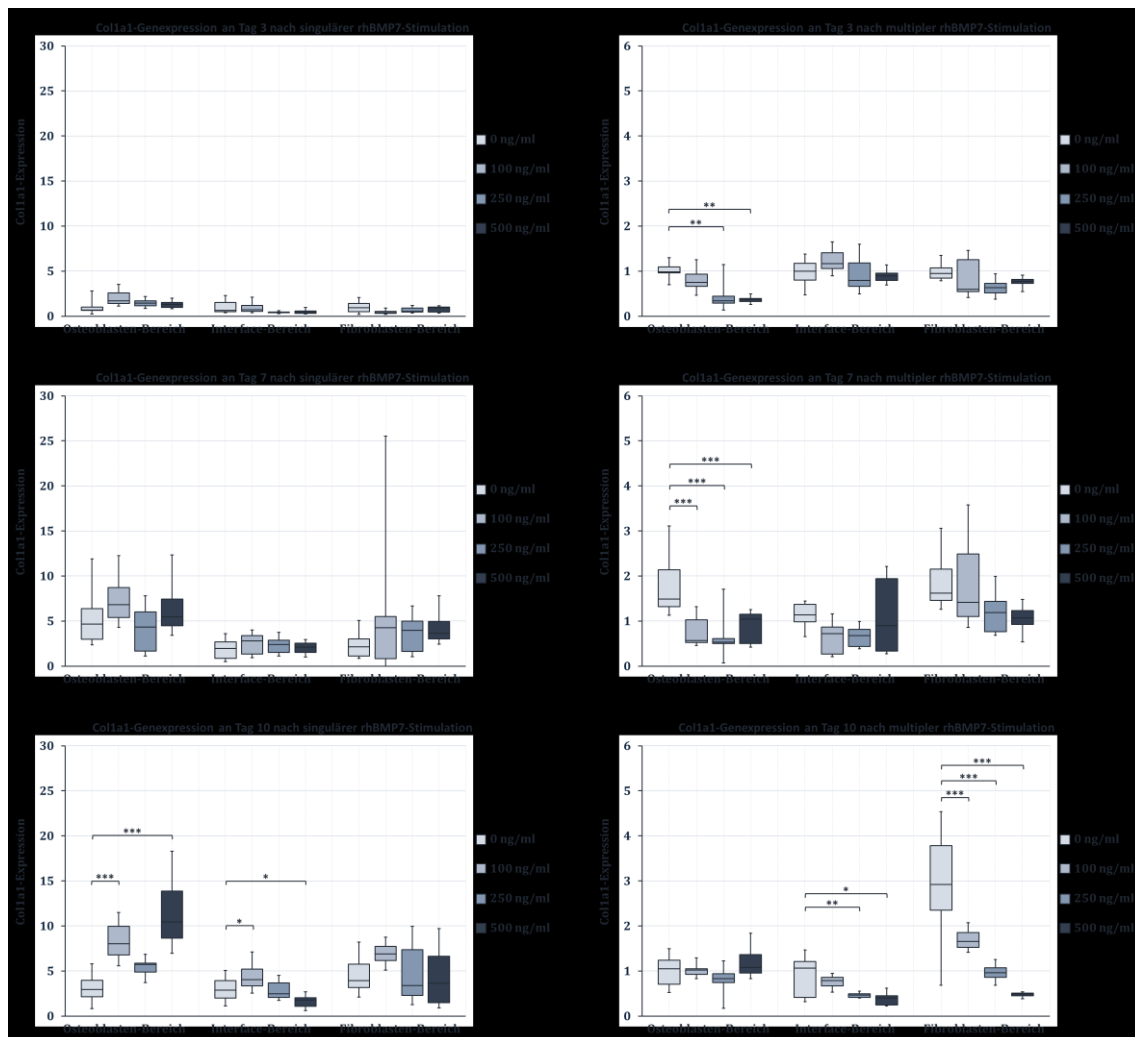


Abbildung 22: Zeitabhängige Col1a1-Genexpression nach singularer und multipler rhBMP7-Stimulation (n = 3)

Es zeigte sich für den 3. Tag nach singularer rhBMP7-Substitution keine signifikanten Col1a1-Veränderungen im Osteoblasten-Bereich.

Bezüglich der multiplen Stimulation resultierten für die rhBMP7-Stimulationen mit 250 ng/ml und 500 ng/ml an Tag 3 im Osteoblasten-Bereich sehr signifikante Reduktionen der Genexpression von Col1a1. Genauer gesagt kam es zu einer Verminderung von 0,98 auf 0,34 ($\approx 2,9$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) für die Dosierung 250 ng/ml und zu einer Reduktion von 0,98 auf 0,37 ($\approx 2,6$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) für die 500 ng/ml-Konzentration rhBMP7.

Am Zeitpunkt 7 Tage ergaben sich analog zu den Ergebnissen nach 3 Tagen keine signifikanten Col1a1-Änderungen nach singularer rhBMP7-Zugabe.

Jedoch zeigten sich bei multipler Stimulation für die Konzentrationen 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml im Osteoblasten-Bereich nach 7 Tagen Verminderungen der Col1a1-

Genexpressionslevel. Für die Dosierung von 100 ng/ml ergab sich nach 7 Tagen eine hoch-signifikante Reduktion von 1,49 auf 0,56 (\approx 2,7-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag), für die Konzentration von 250 ng/ml eine hoch-signifikante Abnahme von 1,49 auf 0,53 (\approx 2,8-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und für die Dosis von 500 ng/ml rhBMP7 eine hoch-signifikante Minderung von 1,49 auf 1,04 (\approx 1,4-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag).

Am Tag 10 zeigten sich hoch-signifikante Col1a1-Erhöhen im Osteoblasten-Bereich, so dass die Applikation von 100 ng/ml rhBMP7 in einer Expressionszunahme von 2,95 auf 8,03 (\approx 2,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und die Zugabe von 500 ng/ml rhBMP7 in einer Erhöhung des Col1a1-Levels von 2,95 auf 10,42 (\approx 3,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) resultierten. Im Interface-Bereich ergab sich für die Konzentration von 100 ng/ml rhBMP7 am 10. Tag ein signifikanter Expressionsanstieg von 2,87 auf 4,05 (\approx 1,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die Dosierung von 500 ng/ml rhBMP7 eine signifikante Col1a1-Abnahme von 2,87 auf 1,78 (\approx 1,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Eine Veränderung der Col1a1-Expression am 10. Tag im Bereich der Fibroblasten nach einfacher rhBMP7-Substitution konnte nicht nachgewiesen werden.

Für die multiple rhBMP7-Zugabe zeigten sich am 10. Tag im Osteoblasten-Bereich keine signifikanten Col1a1-Genexpressionsänderungen, wohingegen im Interface-Bereich und im Fibroblasten-Bereich signifikante Reduktionen resultierten. Im Bereich des Interfaces ergab sich am 10. Tag und für die Konzentration von 250 ng/ml eine sehr signifikante Expressionsminderung von 1,07 auf 0,46 (\approx 2,3-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Darüber hinaus kam es im Interface-Bereich ebenfalls am 10. Tag jedoch für die Dosierung von 500 ng/ml zu einer signifikanten Reduktion von 1,07 auf 0,40 (\approx 2,7-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Im Fibroblasten-Bereich ergaben sich für alle drei Versuchskonzentrationen hoch-signifikante Col1a1-Genexpressionsverminderungen nach 10 Tagen multipler rhBMP7-Stimulation. So zeigte sich für eine rhBMP7-Applikation in der Dosis von 100 ng/ml eine hoch-signifikante Expressionsreduktion von 2,92 auf 1,66 (\approx 1,8-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag), für eine rhBMP7-Stimulation mit 250 ng/ml eine hoch-signifikante Verminderung von 2,92 auf 0,96 (\approx 3,0-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die rhBMP7-Zugabe in einer

Konzentration von 500 ng/ml ein Regress der Col1a1-Expression von 2,92 auf 0,48 ($\approx 6,1$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

3.2.3 Die dosisabhängige Col1a1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Die **Abbildung 23** enthält die dosisabhängigen Auswirkungen der singulären und multiplen rhBMP7-Substitution auf die Expressionslevel von Col1a1. Dabei stellen die oberen beiden Grafiken die Ergebnisse für 100 ng/ml, die mittleren beiden Grafiken die Resultate für 250 ng/ml und die unteren beiden Grafiken die Bilanz für 500 ng/ml rhBMP7-Gabe dar.

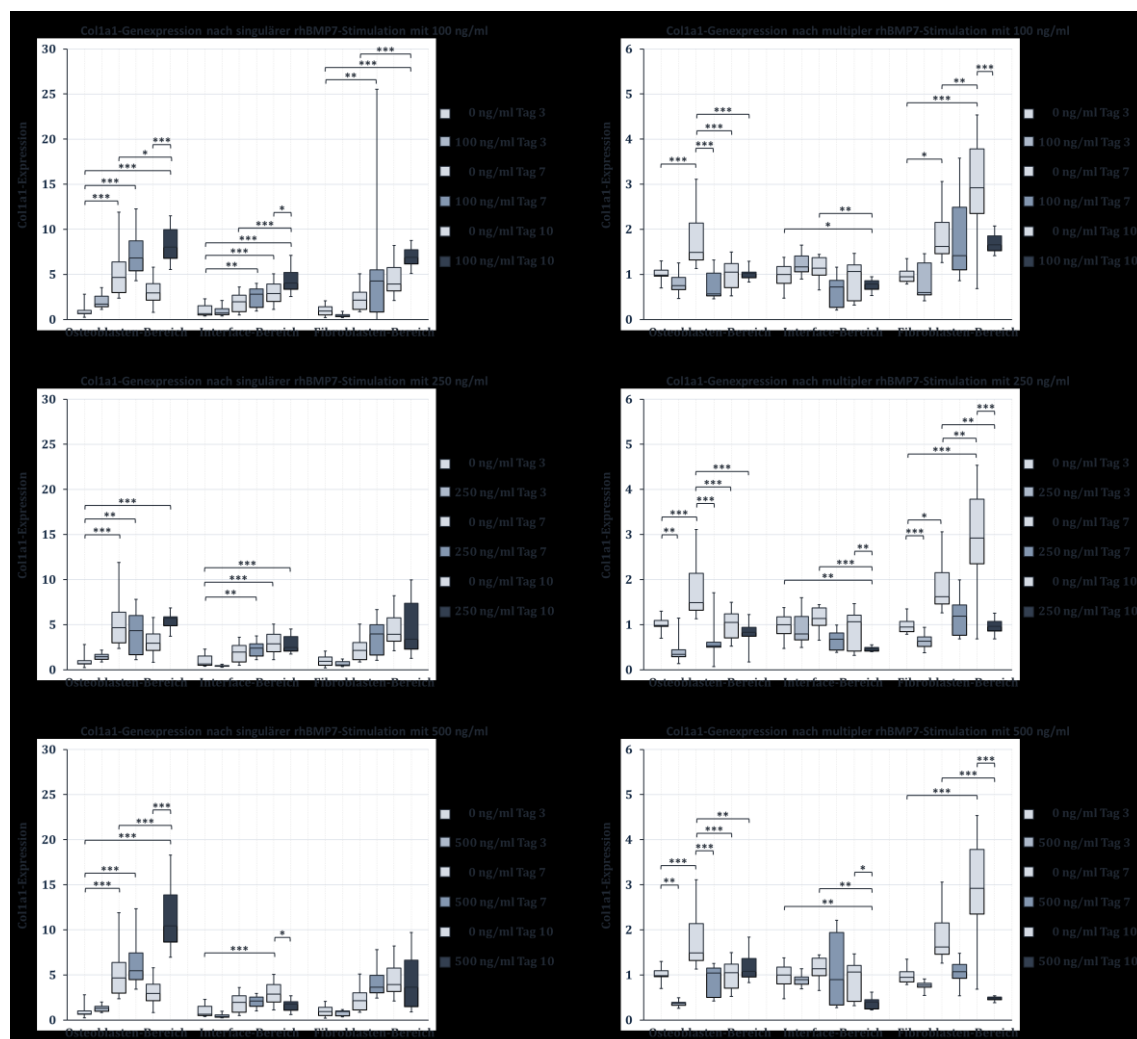


Abbildung 23: Dosisabhängige Col1a1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation ($n = 3$)

Für die singuläre rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml zeigten sich im Osteoblasten-Bereich mehrere signifikante Col1a1-Expressionsänderungen. Für die unstimulierte Kontrolle konnte nach 7 Tage eine hoch-signifikante Expressionserhöhung von 0,67 auf 4,68 ($\approx 7,0$ -

fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) nachgewiesen werden. Darüber hinaus fand sich auch für die singuläre Stimulation mit 100 ng/ml am 7. Tag eine hoch-signifikante Erhöhung des Col1a1-Levels von 0,67 auf 6,82 ($\approx 10,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Weiterhin resultierte eine singuläre rhBMP7-Gabe von 100 ng/ml am 10. Tag in einer Col1a1-Genexpressionserhöhung im Osteoblasten-Bereich. Hier ergab sich eine hoch-signifikante Änderung von 0,67 auf 8,03 ($\approx 12,0$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), ein signifikanter Anstieg von 4,68 auf 8,03 ($\approx 1,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) beziehungsweise ein hoch-signifikanter Zuwachs von 2,95 auf 8,03 ($\approx 2,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Im Interface-Bereich ergab sich eine hoch-signifikante Col1a1-Erhöhung für die unstimulierte Kontrolle am Tag 10 von 0,64 auf 2,87 ($\approx 4,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Weiterhin zeigte sich am Tag 7 eine sehr signifikante Erhöhung des Col1a1-Markers nach singulärer rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml von 0,64 auf 2,80 ($\approx 4,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Die rhBMP7-Applikation in einer Konzentration von 100 ng/ml führte im Interface-Bereich an Tag 10 ebenfalls zu signifikanten Erhöhungen im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen an allen Zeitpunkten. So ergaben sich eine hoch-signifikante Col1a1-Steigerung von 0,64 auf 4,05 ($\approx 6,3$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), ein hoch-signifikanter Anstieg von 1,96 auf 4,05 ($\approx 2,1$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) respektive ein signifikanter Zuwachs der Col1a1-Expression von 2,87 auf 4,05 ($\approx 1,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Für den Fibroblasten-Bereich resultierte nach singulärer rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml eine sehr signifikante Col1a1-Expressionssteigerung von 0,93 auf 4,26 ($\approx 4,6$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) nach 7 Tagen. Weiterhin kam es im Fibroblasten-Bereich nach 10 Tagen zu einem sehr signifikanten Anstieg von 0,93 auf 6,88 ($\approx 7,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) respektive zu einem hoch signifikanten Zuwachs von 2,16 auf 6,88 ($\approx 3,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag).

In der multiplen rhBMP7-Applikation mit 100 ng/ml zeigte sich im Osteoblasten-Bereich für die unstimulierte Kontrolle an Tag 7 eine hoch-signifikante Col1a1-Steigerung von 0,98 auf 1,49 ($\approx 1,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), wohingegen sich für die unstimulierte Kontrolle zum Zeitpunkt 10 Tage eine hoch-signifikante Genexpressionsreduktion von 1,49 auf 1,05 ($\approx 1,4$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) nachweisen ließ. Weiterhin resultierten

hoch-signifikante Col1a1-Abnahmen im Osteoblasten-Bereich an Tag 7 von 1,49 auf 0,56 (\approx 2,7-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) sowie an Tag 10 von 1,49 auf 1,02 (\approx 1,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Im Interface-Bereich kam es nach 10 Tagen einer signifikanten Expressionsreduktion von 1,00 auf 0,78 (\approx 1,3-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) respektive zu einer sehr signifikanten Col1a1-Verminderung von 1,14 auf 0,78 (\approx 1,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Auch im Fibroblasten-Bereich ergab sich eine Genexpressionsveränderung für Col1a1 nach multipler rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml. Nach 7 Tagen zeigte sich für die unstimulierte Kontrolle ein signifikanter Zuwachs der Col1a1-Expression von 0,95 auf 1,62 (\approx 1,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), ebenso resultierte für die unstimulierte Kontrolle an Tag 10 eine hoch-signifikante Genexpressionssteigerung von 0,95 auf 2,92 (\approx 3,1-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) respektive eine sehr signifikante Col1a1-Erhöhung von 1,62 auf 2,92 (\approx 1,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Zuletzt zeigte sich im Fibroblasten-Bereich noch eine hoch-signifikante Col1a1-Genexpressionsreduktion von 2,92 auf 1,66 (\approx 1,8-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nach 10 Tagen im multiplen Stimulationsversuch mit rhBMP7.

In der singulären Stimulation mit 250 ng/ml rhBMP7 ließ sich im Osteoblasten-Bereich für die unstimulierte Kontrolle zum Zeitpunkt 3 Tage eine hoch-signifikante Col1a1-Steigerung von 0,67 auf 4,68 (\approx 7,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) nachweisen. Des Weiteren zeigten sich für die einfache rhBMP7-Applikation in der Konzentration von 250 ng/ml einerseits nach 7 Tagen eine signifikante Col1a1-Erhöhung von 0,67 auf 4,35 (\approx 6,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits nach 10 Tagen eine hoch-signifikante Genexpressionszunahme von 0,67 auf 5,71 (\approx 8,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Im Interface-Bereich ergab sich für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag eine hoch-signifikante Progression der Col1a1-Genexpression von 0,64 auf 2,87 (\approx 4,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Darüber hinaus zeigte sich für den einfachen Stimulationsansatz mit 250 ng/ml rhBMP7 am Tag 7 eine signifikante Expressionserhöhung von 0,64 auf 2,40 (\approx 3,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise am Tag 10 eine hoch-signifikante Steigerung von 0,64 auf 2,47 (\approx 3,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Im Fibroblasten-Bereich resultierten für die Konzentration von 250

ng/ml in der singulären rhBMP7-Stimulation keine signifikanten Änderungen der Col1a1-Genexpression.

Für die mehrfachen rhBMP7-Applikation in einer Konzentration von 250 ng/ml zeigten sich sowohl im Osteoblasten-Bereich als auch im Fibroblasten-Bereich und im Interface-Bereich signifikante Veränderungen bezüglich der Col1a1-Genexpression. So ließ sich für die osteoblastischen Zellen eine hoch-signifikante Col1a1-Levelsteigerung für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag von 0,98 auf 1,49 ($\approx 1,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) nachweisen. Dem gegenüber kam es für die unstimulierte Kontrolle nach 10 Tagen zu einer hoch-signifikanten Erniedrigung von 1,49 auf 1,05 ($\approx 1,4$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Darüber hinaus zeigte sich zu allen Zeitpunkten für die Applikation von 250 ng/ml eine Reduktion der Col1a1-Expression. Präziser formuliert ergab sich eine sehr signifikante Erniedrigung des Col1a1-Levels am 3. Tag von 0,98 auf 0,34 ($\approx 2,9$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und eine hoch-signifikante Col1a1-Abnahme am 7. Tag von 1,49 auf 0,53 ($\approx 2,8$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) beziehungsweise am 10. Tag von 1,49 auf 0,83 ($\approx 1,8$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Im Bereich des Interfaces zeigten sich für die multiple Stimulation mit rhBMP7 in einer Konzentration von 250 ng/ml signifikante Col1a1-Erniedrigungen am 10. Tag in Bezugnahme auf die unstimulierten Kontrollen. Es ließ sich eine sehr signifikante Col1a1-Expressionsverminderung am 10. Tag von 1,00 auf 0,46 ($\approx 2,2$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise von 1,07 auf 0,46 ($\approx 2,3$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) sowie eine hoch-signifikante Genexpressionsabnahme von 1,14 auf 0,46 ($\approx 2,5$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) nachweisen. Im Fibroblasten-Bereich kam es für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag zu einer signifikanten Col1a1-Erhöhung von 0,95 auf 1,62 ($\approx 1,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Am 10. Tag ergab sich einerseits im Vergleich zur unkontrollierten Kontrolle am 3. Tag eine hoch-signifikante Expressionszunahme von 0,95 auf 2,92 ($\approx 3,1$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits vergleichend zur Kontrolle zum Zeitpunkt 10 Tage eine sehr signifikante Genexpressionssteigerung von 1,62 auf 2,92 ($\approx 1,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Für die mehrfache rhBMP7-Stimulation mit einer Dosierung von 250 ng/ml resultierte nach 3 Tagen eine hoch-signifikante Col1a1-Genexpressionsreduktion von 0,95 auf 0,63 ($\approx 1,5$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Ebenfalls ergab sich nach 10 Tagen der mehrfachen rhBMP7-Applikation eine sehr signifikante Col1a1-

Verminderung von 1,62 auf 0,96 (\approx 1,7-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) in Relation zur unstimulierten Kontrolle des 7. Tages beziehungsweise eine hoch-signifikante Reduktion der Col1a1-Genexpression von 2,92 auf 0,96 (\approx 3,0-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) im Bezugnahme auf den Kontrollwert am Zeitpunkt nach 10 Tagen.

In Betrachtung der Ergebnisse der singulären rhBMP7-Stimulation mit 500 ng/ml zeigten sich sowohl im Osteoblasten-Bereich als auch im Interface-Bereich signifikante Col1a1-Expressionsänderungen, wohingegen sich keine signifikanten Genlevel-Einflüsse im Fibroblasten-Bereich ergaben. Es resultierte im Osteoblasten-Bereich für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag eine hoch-signifikante Col1a1-Erhöhung von 0,67 auf 4,68 (\approx 7,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Weiterhin ließ sich für die singuläre Stimulation mit 500 ng/ml rhBMP7 nach 7 Tagen eine hoch-signifikante Genexpressionssteigerung von 0,67 auf 5,48 (\approx 8,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) in Bezug auf die Kontrolle am 3. Tag nachweisen. Ebenfalls zeigten sich nach 10 Tagen der singulären Versuchsdurchführung hoch-signifikante Col1a1-Erhöhrungen im Vergleich zu allen unstimulierten Kontrollen. Präziser formuliert ergaben sich Anstiege von 0,67 auf 10,42 (\approx 15,6-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) vergleichend zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag, von 4,68 auf 10,42 (\approx 2,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) in Relation zur Kontrolle nach 7 Tagen und von 2,95 auf 10,42 (\approx 3,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nach 10 Tagen. Im Interface-Bereich konnte eine hoch-signifikante Col1a1-Erhöhrung für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag von 0,64 auf 2,87 (\approx 4,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beobachtet werden. Darüber hinaus resultierte für die singuläre Stimulation mit 500 ng/ml rhBMP7 im Fibroblasten-Bereich nach 10 Tagen eine signifikante Col1a1-Genexpressionsabnahme von 3,91 auf 2,02 (\approx 1,9-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Wie bereits zuvor erwähnt, zeigten sich im Fibroblasten-Bereich keine signifikanten Auswirkungen einer singulären rhBMP7-Substitution hinsichtlich der Genexpression von Col1a1.

In der mehrfachen rhBMP7-Stimulation mit einer Dosierung von 500 ng/ml kam es in allen untersuchten experimentellen Bereichen zu signifikanten Genleveländerungen bezüglich des Col1a1-Markers. Während sich für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag eine hoch-signifikante Col1a1-Erhöhrung von 0,98 auf 1,49 (\approx 1,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beobachtet werden konnte, lie sich für die Kontrolle

ohne rhBMP7-Zugabe am Zeitpunkt 10 Tage ein hoch-signifikanter Col1a1-Genlevelabfall von 1,49 auf 1,05 (\approx 1,4-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) nachweisen. Darüber hinaus zeigte sich am 3. Tag der multiplen rhBMP7-Stimulation mit 500 ng/ml eine sehr signifikante Col1a1-Reduktion von 0,98 auf 0,37 (\approx 2,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Ebenfalls kam nach 7 Tagen zu einer hoch-signifikanten Genexpressionsabnahme von 1,49 auf 1,04 (\approx 1,4-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und nach 10 Tagen zu einer sehr signifikanten Expressionsverminderung von 1,49 auf 1,08 (\approx 1,4-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Im Interface-Bereich ergab sich für die mehrfache rhBMP7-Applikation mit einer rhBMP7-Konzentration von 500 ng/ml eine sehr signifikante Verminderung der Col1a1-Expression nach 10 Tagen von 1,00 auf 0,40 (\approx 2,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise von 1,14 auf 0,40 (\approx 2,9-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag resultierte im Interface-Bereich eine signifikante Col1a1-Expressionsverminderung von 1,07 auf 0,40 (\approx 2,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für die multiple rhBMP7-Applikation mit 500 ng/ml. Im Fibroblasten-Bereich kam es zu drei hoch-signifikanten Col1a1-Änderungen. So zeigte sich einerseits für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag im Vergleich zur Kontrolle am 3. Tag eine hoch-signifikante Genexpressionserhöhung von 0,95 auf 2,92 (\approx 3,1-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), andererseits zeigt die mehrfache Stimulation mit 500 ng/ml rhBMP7 eine hoch-signifikante Reduktion der Col1a1-Expression von 1,62 auf 0,48 (\approx 3,4-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) in Bezug auf die Kontrolle am 7. Tag beziehungsweise von 2,92 auf 0,48 (\approx 6,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) in Relation zur unstimulierten Kontrolle des 10. Tages.

3.3 Die Alp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Die nachfolgenden Abschnitte befassen sich mit den Genexpressionsleveln für Alp1 unter Berücksichtigung der Veränderungen besagter Expressionsniveaus nach singulärer beziehungsweise multipler rhBMP7-Applikation. Nachdem im ersten Subkapitel die bereichsabhängigen Ergebnisse beschrieben werden, werden im zweiten und im dritten Unterkapitel die Resultate zeitabhängig beziehungsweise dosisabhängig analysiert.

3.3.1 Die bereichsabhängige Alp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

In den Grafiken der **Abbildung 24** sind die Effekte der einfachen und mehrfachen rhBMP7-Substitution auf die Alp1-Genexpressionsniveaus grafisch dargestellt. In einer Reihenfolge von oben nach unten zeigen die Grafiken die Alp1-Expressionsänderungen oben im Osteoblasten-Bereich, mittig im Interface-Bereich und unten im Fibroblasten-Bereich.

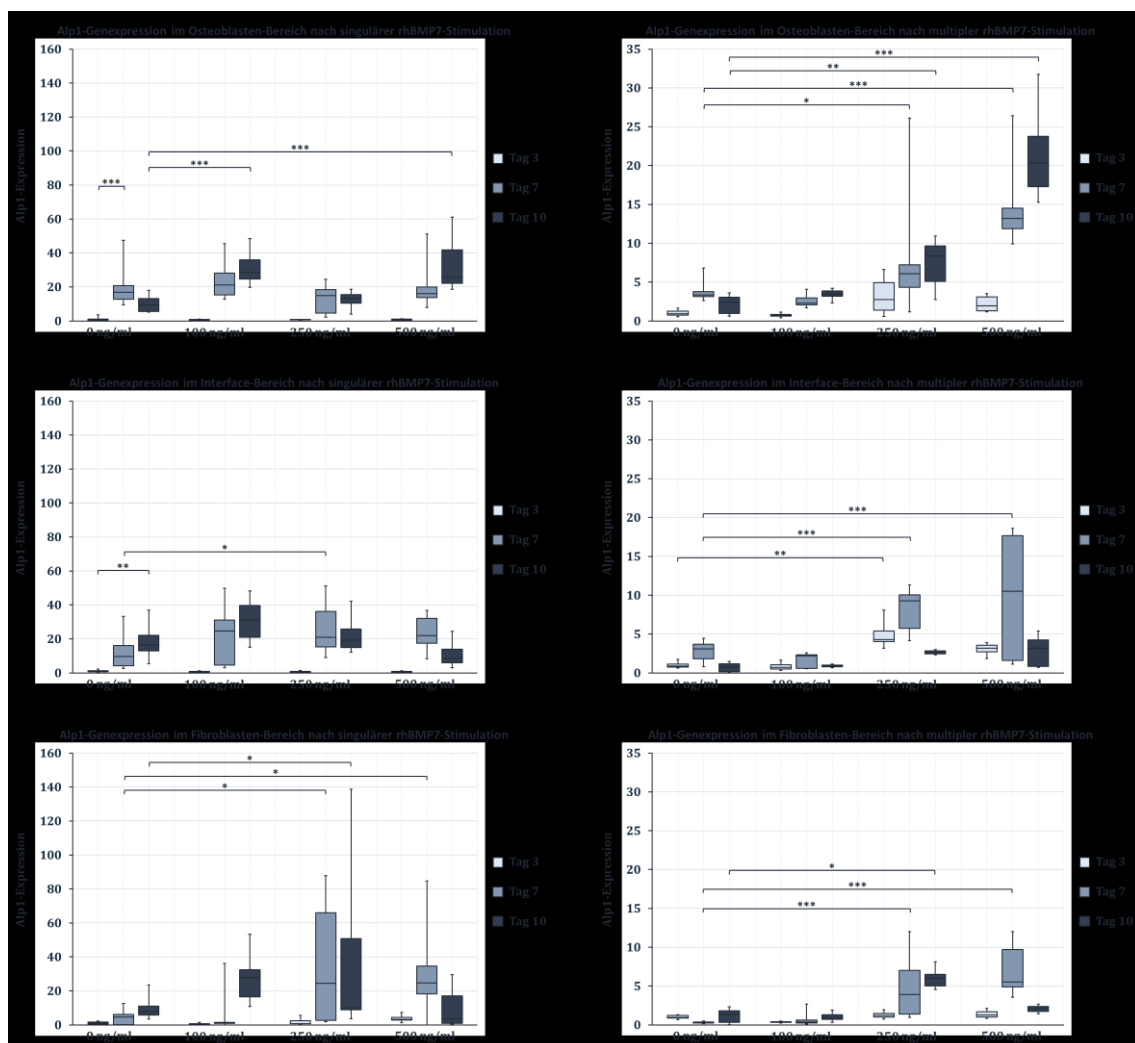


Abbildung 24: Bereichsabhängige Alp1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation (n = 3)

Im Osteoblasten-Bereich zeigte sich im singulären rhBMP7-Stimulationsversuch eine hoch-signifikante Alp1-Erhöhung für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag von 0,42 auf 16,95 ($\approx 40,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Ebenfalls ergaben sich für die Konzentrationen 100 ng/ml und 500 ng/ml rhBMP7 nach 10 Tagen hoch signifikanten Alp1-Anstiege mit einer Wertsteigerung von 9,45 auf 28,54 ($\approx 3,0$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für 100 ng/ml beziehungsweise von 9,45 auf 25,85 ($\approx 2,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für 500 ng/ml rhBMP7.

Nach multipler rhBMP7-Stimulation zeigte sich im Osteoblasten-Bereich für die Konzentration von 250 ng/ml am 7. Tag der Versuche eine signifikante Alp1-Erhöhung von 3,34 auf 6,09 ($\approx 1,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und für die Konzentration von 500 ng/ml ebenfalls am 7. Tag ein hoch-signifikanter Anstieg der Alp1-Expression von 3,34 auf 13,19 ($\approx 3,9$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Am 10. Tag der multiplen Stimulation ergab sich für die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP7 ein sehr signifikanter Alp1-Progress von 2,40 auf 8,39 ($\approx 3,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag), ebenso kam es für die Dosierung von 500 ng/ml am 10. Tag zu einer hoch-signifikanten Alp1-Expressionssteigerung von 2,40 auf 20,33 ($\approx 8,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Für den Interface-Bereich resultierte die einfache rhBMP7-Applikation für die Konzentration 250 ng/ml am 7. Tag der Versuchsdurchführung in einer signifikanten Steigerung der Alp1-Genexpression von 9,59 auf 21,02 für die ($\approx 2,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Ebenfalls zeigte sich für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag eine sehr signifikante Alp1-Expressionslevel-Erhöhung von 0,81 auf 16,51 ($\approx 20,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag).

Auch im Interface-Bereich ließen durch die multiple rhBMP7-Stimulation steigernde Effekte auf die Alp1-Genexpression nachweisen. So ergab sich nach 3 Tagen und für die Konzentration von 250 ng/ml ein sehr signifikanter Alp1-Expressionszuwachs von 0,90 auf 4,28 ($\approx 4,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 4. Tag). Nach 7 Tagen der mehrfachen rhBMP7-Zugabe zeigten sich für die Konzentration von 250 ng/ml ein hoch-signifikanter Alp1-Expressionszuwachs von 3,10 auf 9,26 ($\approx 3,0$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und für die Dosierung mit 500 ng/ml rhBMP7 ein ebenfalls hoch-signifikanter Alp1-Anstieg von 3,10 auf 10,52 ($\approx 3,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag).

Im Bereich der Fibroblasten zeigten sowohl die singuläre als auch die multiple rhBMP7-Stimulation steigernde Wirkungen auf die Alp1-Genexpression. Im singulären Ansatz ergaben sich drei jeweils signifikante Erhöhungen. Präzisierend zeigte sich für die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP7 am 7. Tag ein signifikanter Alp1-Anstieg von 4,57 auf 24,49 ($\approx 5,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag), für die Konzentration von 500 ng/ml am 7. Tag ein signifikanter Zuwachs der Alp1-Expression von 4,57 auf 24,70 ($\approx 5,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und für die Dosierung mit 250 ng/ml rhBMP7 am 10. Tag der Versuchsdurchführung ein signifikanter Alp1-Genlevelprogress von 7,82 auf 10,0 ($\approx 1,3$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Für die multiple Applikation von rhBMP7 kam es im Fibroblasten-Bereich nach 7 Tagen zu einem hoch-signifikantem Zuwachs der Alp1-Expression für die Konzentrationen von 250 ng/ml und von 500 ng/ml. Hier ergab sich eine hoch-signifikante Wertsteigerung von 0,28 auf 3,92 ($\approx 14,0$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für die Dosis mit 250 ng/ml beziehungsweise von 0,28 auf 5,51 ($\approx 19,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für die Konzentration von 500 ng/ml. Darüber hinaus zeigte sich noch ein signifikanter Alp1-Anstieg für eine rhBMP7-Dosis von 250 ng/ml nach 10 Tagen von 1,33 auf 5,98 ($\approx 4,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

3.3.2 Die zeitabhängige Alp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Die einzelnen Diagramme der **Abbildung 25** visualisieren die Alp1-Genexpressionen an den unterschiedlichen Kontrollzeitpunkten und stellen die statistisch signifikanten Veränderungen nach singulärer respektive multipler Stimulation mit rhBMP7 dar. Dabei bilden die beiden oben angeordneten Grafiken die Alp1-Genexpression nach 3 Tagen, die beiden mittig angeordneten Grafiken die Genexpression nach 7 Tagen und die beiden unten angeordneten Grafiken die Genexpression am 10. Tag ab.

Für die singuläre rhBMP7-Stimulation am 3. Tag zeigten sich weder im Osteoblasten-Bereich noch im Fibroblasten-Bereich oder im Interface-Bereich signifikanten Alp1-Expressionsänderungen. Hinsichtlich der multiplen rhBMP7-Applikation ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Alp1-Beeinflussungen im Osteoblasten-Bereich oder im Fibroblasten-Bereich. Lediglich im Interface-Bereich kam es nach 3 Tagen für die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP7 zu einer sehr signifikanten Alp1-Erhöhung von 0,90 auf 4,28 ($\approx 4,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag).

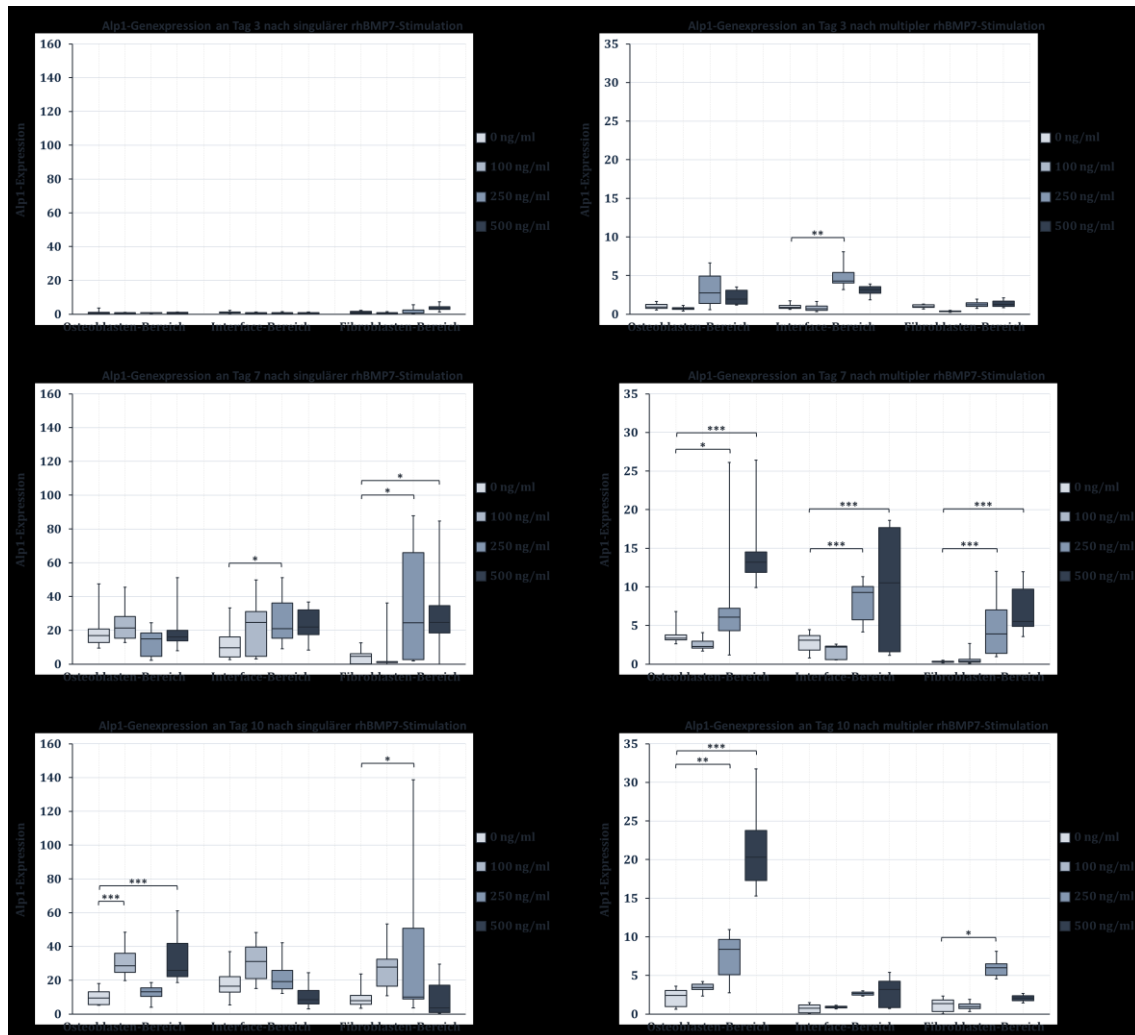


Abbildung 25: Zeitabhängige Alp1-Genexpression nach singularer und multipler rhBMP7-Stimulation (n = 3)

Während es zum Zeitpunkt 7 Tage im Interface-Bereich für die singuläre Stimulation mit rhBMP7 in einer Konzentration von 250 ng/ml zu einer signifikanten Erhöhung der Alp1-Expression von 9,59 auf 21,02 ($\approx 2,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) kam, resultierte für die einfache rhBMP7-Applikation im Osteoblasten-Bereich keine signifikante Alp1-Änderung nach 7 Tagen. Im Fibroblasten-Bereich zeigten sich singulärer rhBMP7-Zugabe zwei signifikante Wertänderungen. So kam es einerseits für die Dosierung von 250 ng/ml zu einer signifikanten Alp1-Steigerung von 4,57 auf 24,49 ($\approx 5,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und andererseits für die Konzentration von 500 ng/ml zu einem signifikanten Alp1-Anstieg von 4,57 auf 24,70 ($\approx 5,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Bezüglich der multiplen rhBMP7-Stimulation zeigten sich nach 7 Tagen Versuchsdauer in allen Bereichen signifikante Erhöhungen der Alp1-Genexpression. Im Osteoblasten-Bereich resultierte für die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP7 eine signifikante Erhöhung der Alp1-Expression von 3,34 auf 6,09 ($\approx 1,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten

Kontrolle am 7. Tag) und eine hoch-signifikante Alp1-Steigerung von 3,34 auf 13,19 (\approx 3,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Im Interface-Bereich ließen sich am 7. Tag nach multipler rhBMP7-Applikation hoch-signifikante Anstiege für die Konzentrationen von 250 ng/ml und 500 ng/ml nachweisen. Präziser gesagt kam es für die Dosierung von 250 ng/ml zu einem Alp1-Zuwachs von 3,10 auf 9,26 (\approx 3,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und für die 500 ng/ml-Konzentration zu einer Zunahme der Alp1-Genexpression von 3,10 auf 10,52 (\approx 3,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Hinsichtlich des Bereiches der Fibroblasten resultierten für die Konzentration von 250 ng/ml am 7. Tag eine hoch-signifikante Alp1-Erhöhung von 0,28 auf 3,92 (\approx 14-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und für die Dosierung von 500 ng/ml nach 7 Tagen eine ebenfalls hoch-signifikante Alp1-Steigerung von 0,28 auf 5,51 (\approx 19,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag).

In der Untersuchung der singulären rhBMP7-Applikation am 10. Tag der Versuchsdurchführungen zeigte sich für die Alp1-Genexpression im Osteoblasten-Bereich neben einer hoch-signifikanten Erhöhung für die Konzentration von 100 ng/ml mit einer Wertsteigerung von 9,45 auf 28,54 (\approx 3,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) ebenfalls eine hoch-signifikante Alp1-Expressionszunahme für die Dosierung von 500 ng/ml rhBMP7 von 9,45 auf 25,85 (\approx 2,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Während es nach 10 Tagen rhBMP7-Zugabe im singulären Versuchsansatz im Interface-Bereich zu keiner signifikanten Alp1-Expressionsalternation kam, resultierte für den Fibroblasten-Bereich für die Konzentration von 250 ng/ml eine signifikante Erhöhung der Alp1-Expression von 7,82 auf 10,0 (\approx 1,3-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Im multiplen rhBMP7-Stimulationsversuch konnten nach 10 Tagen im Interface-Bereich keine signifikanten Änderungen der Alp1-Genexpression nachgewiesen werden, wohingegen sich im Osteoblasten-Bereich und im Fibroblasten-Bereich signifikante Alp1-Erhönungen zeigten. So lässt sich für die Konzentration von 250 ng/ml im Fibroblasten-Bereich ein signifikanter Alp1-Anstieg von 1,33 auf 5,98 (\approx 4,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) beobachten. Darüber hinaus konnte im Osteoblasten-Bereich für die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP7 eine sehr signifikante Alp1-Zunahme von 2,40 auf 8,39 (\approx 3,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die Dosierung 500 ng /ml eine hoch-signifikante Alp1-Steigerung von 2,40 auf 20,33 (\approx 8,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachgewiesen werden.

3.3.3 Die dosisabhängige Alp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

In der **Abbildung 26** werden die dosisabhängigen Auswirkungen der singulären und multiplen rhBMP7-Substitution auf die Expressionslevel von Col1a1 dargestellt. Die oberen Grafiken zeigen die Ergebnisse für die Konzentration von 100 ng/ml rhBMP7, die mittleren Grafiken die Resultate für die Dosis von 250 ng/ml rhBMP7 und die unteren Grafiken die Alp1-Expression für die Dosierung von 500 ng/ml rhBMP7.

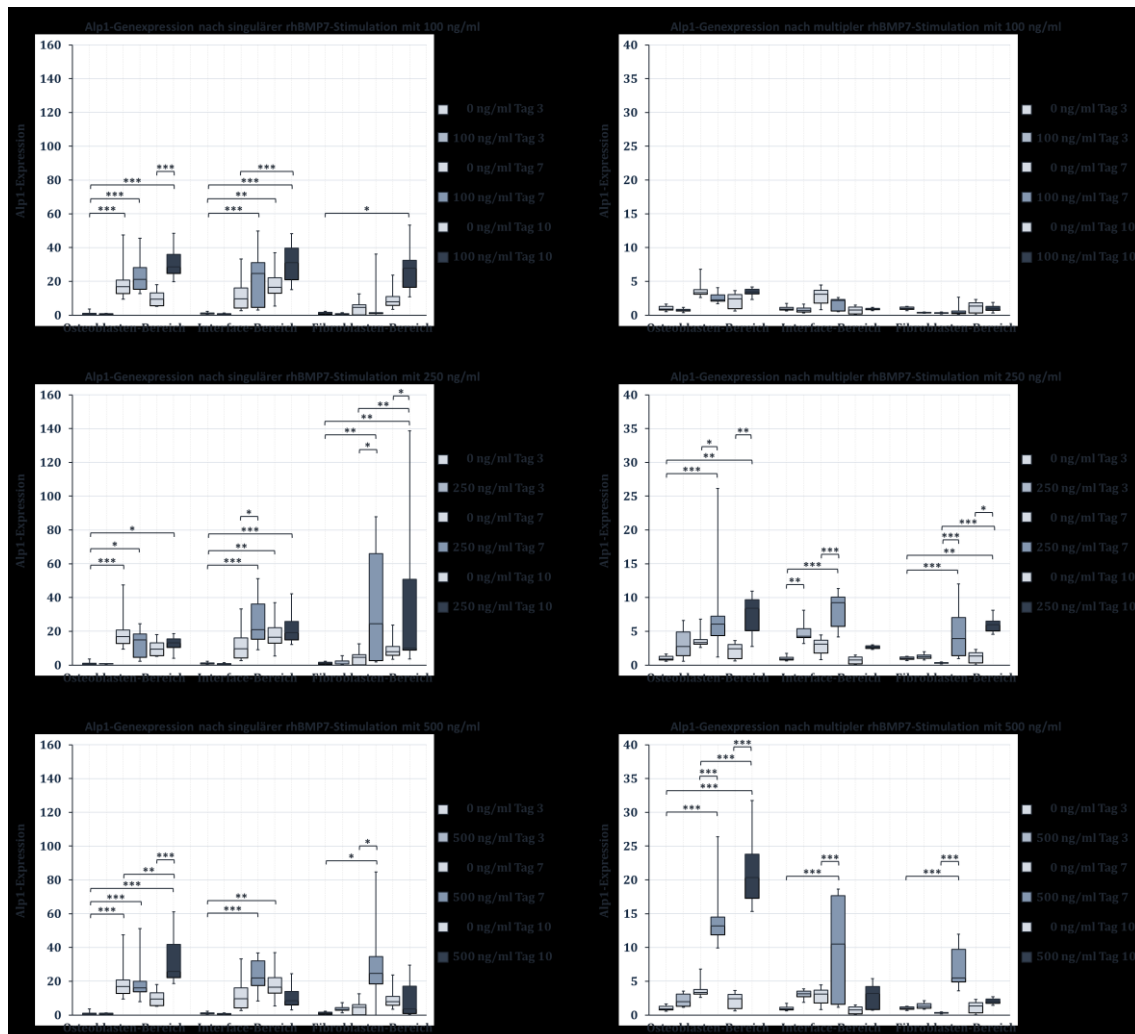


Abbildung 26: Dosisabhängige Alp1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation (n = 3)

Für die singuläre Stimulation mit einer Konzentration von 100 ng/ml zeigten sich im Osteoblasten-Bereich am 7. Tag sowohl eine hoch-signifikante Alp1-Erhöhung für die unstimulierte Kontrolle mit einer Wertsteigerung von 0,42 auf 16,95 ($\approx 40,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) als auch eine hoch-signifikante Expressionssteigerung für die Dosierung vom 100 ng/ml mit einer Werterhöhung von 0,42 auf 21,26 ($\approx 50,6$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Weiterhin ergaben sich hoch-signifikante Expressionserhöhungen am

Tag 10 für die singuläre Stimulation mit 100 ng/ml rhBMP7 im Osteoblasten-Bereich. Hier kam es zu einem hoch-signifikanten Alp1-Anstieg von 0,42 auf 28,54 ($\approx 68,0$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag beziehungsweise zur hoch-signifikanten Zunahme der Alp1-Expression von 9,45 auf 28,54 ($\approx 3,0$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) in Relation zur Kontrolle am 10. Tag. Im Interface-Bereich resultierte für die unstimulierte Kontrolle an Tag 10 eine sehr signifikante Erhöhung der Alp1-Expression von 0,81 auf 16,51 ($\approx 20,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Darüber hinaus zeigten sich für die Konzentration von 100 ng/ml sowohl am 7. Tag als auch am 10. Tag hoch-signifikante Alp1-Expressionszunahmen mit Wertsteigerungen von 0,81 auf 24,69 ($\approx 30,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise von 0,81 auf 31,02 ($\approx 38,3$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Desweiteren ließ sich im Interface-Bereich am 10. Tag eine sehr signifikante Alp1-Erhöhung für die Dosierung von 100 ng/ml und in Bezugnahme auf die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag nachweisen, hier resultiert eine Werterhöhung von 9,59 auf 31,02 ($\approx 3,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Im Bereich der Fibroblasten kam es für die Dosierung von 100 ng/ml am Zeitpunkt 10 Tage zu einer signifikanten Alp1-Genexpressionssteigerung von 1,07 auf 27,76 ($\approx 25,9$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag).

Im multiplen Stimulationsansatz mit 100 ng/ml rhBMP7 zeigten sich bezüglich der Alp1-Expression weder im Osteoblasten-Bereich noch im Interface-Bereich signifikante Änderungen. Ebenso ließen sich im Fibroblasten-Bereich keine signifikanten Steigerungen oder Reduktionen der Alp1-Genexpressionsniveaus beobachten.

Für die singuläre Stimulation mit rhBMP7 in einer Konzentration von 250 ng/ml ergaben sich im Osteoblasten-Bereich einerseits ein hoch-signifikante Alp1-Anstieg für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag mit einer Wertsteigerung von 0,42 auf 16,95 ($\approx 40,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits eine signifikante Genexpressionssteigerung für 250 ng/ml rhBMP7 ebenfalls an Tag 7 mit einem Werteprogess von 0,42 auf 14,95 ($\approx 35,6$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Am 10. Tag der Versuchsdurchführungen zeigten sich desweiteren im Osteoblasten-Bereich eine signifikante Zunahme der Alp1-Expression von 0,42 auf 13,19 ($\approx 31,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) nach singulärer rhBMP7-Stimulation mit einer Dosis von 250 ng/ml. Im Interface-Bereich resultierte für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag eine sehr signifikante Alp1-Steigerung von 0,81 auf

16,51 (\approx 20,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Darüber hinaus erageben sich für die singuläre rhBMP7-Substitution mit 250 ng/ml im Interface-Bereich ergeben einerseits im Vergleich zur Kontrolle am 3. Tag ein hoch-signifikante Zunahme der Alp1-Genexpression am 7. Tag von 0,81 auf 21,02 (\approx 20,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits in Bezug auf die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag eine signifikante Alp1-Steigerung von 9,59 auf 21,02 (\approx 2,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Auch am 10. Tag der experimentellen Durchführung kam es für die Konzentration von 250 ng/ml im Interface-Bereich zu einem signifikanten Alp1-Zuwachs. So ergab sich diesbezüglich ein hoch-signifikanter Expressionsprogress von 0,81 auf 19,15 (\approx 23,6-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Im Fibroblasten-Bereich zeigte sich für die singuläre Stimulation mit 250 ng/ml rhBMP7 am Tag 7 eine signifikante Alp1-Steigerung. Bezogen auf die Kontrolle am Tag 3 kam es hier zu einer Erhöhung von 1,07 auf 24,49 (\approx 22,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), wohingegen in Relation zur Kontrolle am Tag 7 ein Wertzuwachs von 4,57 auf 24,49 (\approx 5,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) zu beobachten war. Ebenso zeigten sich nach 10 Tagen Versuchsdauer signifikante Erhöhungen der Alp1-Genexpression. Je nachdem welcher Kontrollzeitpunkt zum Vergleich herangezogen wurde, ließen sich eine sehr signifikante Expressionserhöhung von 1,07 auf 10,00 (\approx 9,3-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), eine sehr signifikante Steigerung von 4,57 auf 10,00 (\approx 2,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und eine signifikanten Zunahme der Alp1-Genexpression von 7,82 auf 10,00 (\approx 1,3-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachweisen.

In der mehrfachen Applikation von rhBMP7 in einer Konzentration von 250 ng/ml ergab sich im Osteoblasten-Bereich nach einer Versuchsdauer von 7 Tagen einerseits eine hoch-signifikante Alp1-Steigerung von 0,91 auf 6,09 (\approx 6,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) in Bezugnahme auf die unstimulierte Kontrolle nach 3 Tagen und andererseits eine signifikante Genexpressionserhöhung von 3,34 auf 6,09 (\approx 1,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) im Vergleich zur Kontrolle am Zeitpunkt 7 Tage. Sehr signifikante Alp1-Zunahmen zeigten sich ebenfalls am Tag 10, an welchem eine Genexpressions-Zunahme von 0,91 auf 8,39 (\approx 9,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) in Relation zur Kontrolle am 3. Tag und ein Werte-Anstieg von 2,40 auf 8,39 (\approx 3,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) in Bezug auf die Kontrolle nach 7 Tagen zu beobachten war. Für den Interface-Bereich ließen sich in multiplen Stimulationsansatz mit 250 ng/ml

rhBMP7 mehrere Alp1-Steigerungen nachweisen. So kam es nach 3 Tagen zu einer sehr signifikanten Alp1-Erhöhung von 0,90 auf 4,28 (\approx 4,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Desweiteren ergaben sich nach 7 Tagen hoch-signifikante Zunahmen der Alp1-Genexpression von 0,90 auf 9,26 (\approx 10,3-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) in Bezugnahme auf die unstimulierte Kontrolle am 3. Tag beziehungsweise von 3,10 auf 9,26 (\approx 3,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) bei Referenzierung auf die Kontrolle am 7. Tag. Im Bereich der Fibroblasten ließ sich nach multipler rhBMP7-Stimulation mit einer Dosierung von 500 ng/ml für den Zeitpunkt 7 Tage eine hoch-signifikante Alp1-Zunahme nachweisen. Hier ergaben sich einerseits bei Verwendung der unstimulierten Kontrolle am 3. Tag als Referenz eine Wertsteigerung von 0,98 auf 3,92 (\approx 4,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise andererseits im Vergleich zur Kontrolle am 7. Tag der Versuchsdurchführung eine Expressions-Erhöhung von 0,28 auf 3,92 (\approx 14,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Auch am 10. Tag der Versuchsdurchführung ergaben sich relevante Alp1-Veränderungen. Im Vergleich zur Kontrolle am Tag 3 resultierte eine sehr signifikante Alp1-Erhöhung von 0,98 auf 5,98 (\approx 6,1-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Wurden die Kontrollen nach 7 oder 10 Tagen als Referenz verwendet, ergab sich entweder eine hoch-signifikante Genexpressionssteigerung von 0,28 auf 5,98 (\approx 21,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) oder eine signifikante Alp1-Zunahme von 1,33 auf 5,98 (\approx 4,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Im Osteoblasten-Bereich zeigte sich für die Konzentration von 500 ng/ml im singulären Stimulationsversuch für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag eine hoch-signifikante Alp1-Steigerung von 0,42 auf 16,95 (\approx 40,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Weiterhin ergab sich für die Dosierung von 500 ng/ml rhBMP7 ein hoch-signifikanter Genexpressionszuwachs von 0,42 auf 16,03 (\approx 38,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Ebenfalls kam es am Tag 10 für die einfache Stimulation mit rhBMP7 in einer Konzentration von 500 ng/ml zu signifikanten Alp1-Erhöhrungen. Je nachdem, welche Kontrolle zum Vergleich herangezogen wurde, ergaben sich eine hoch-signifikante Steigerung von 0,42 auf 25,85 (\approx 61,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), eine sehr signifikante Alp1-Zunahme von 16,95 auf 25,85 (\approx 1,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und eine hoch-signifikante Erhöhung der Alp1-Expression von 9,45 auf 25,85 (\approx 2,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Im Interface-Bereich zeigte die singuläre rhBMP7-Substitution mit einer Dosierung von 500 ng/ml eine

hoch-signifikante Alp1-Erhöhung am Tag 7 von 0,81 auf 22,00 ($\approx 27,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Auch für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag resultierte eine sehr signifikante Zunahme der Alp1-Genexpression von 0,81 auf 16,51 ($\approx 20,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Für die Zellpopulation im Fibroblasten-Bereich ließen sich nach singulärer Stimulation mit 500 ng/ml rhBMP7 am 7. Tag der Versuchsdurchführung signifikante Alp1-Expressionszunahmen nachweisen. Diesbezüglich und unter Bezugnahme auf die unstimulierte Kontrolle am 3. Tag ergab sich eine Alp1-Expressionssteigerung von 1,07 auf 24,70 ($\approx 23,1$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), wohingegen bei Referenzierung auf die Kontrolle am 7. Tag eine Erhöhung von 4,57 auf 24,70 ($\approx 5,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) zu beobachten war.

Für die multiple Applikation von rhBMP7 in einer Konzentration von 500 ng/ml zeigten sich im Osteoblasten-Bereich nach 7 Tagen hoch-signifikante Alp1-Steigerungen. Sowohl in Bezug auf die Kontrolle zum Zeitpunkt 3 Tage als auch in Relation zur unstimulierten Kontrolle nach 7 Tagen ergaben sich mit Wertsteigerung von von 0,91 auf 13,19 ($\approx 14,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise von 3,34 auf 13,19 ($\approx 3,9$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) Anstiege der Alp1-Genexpressionsniveaus. Nach 10 Tagen resultierten im Osteoblasten-Bereich ebenfalls hoch-signifikante Alp1-Genexpressionserhöhungen. Hier ließen sich für den Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nach 3 Tagen eine hoch-signifikante Steigerung von 0,91 auf 20,33 ($\approx 22,3$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), für den Bezug zur Kontrolle am 7. Tag eine hoch-signifikante Erhöhung von 3,34 auf 20,33 ($\approx 6,1$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und unter Berücksichtigung der Kontrolle nach 10 Tagen ein Zuwachs der Alp1-Expression von 2,40 auf 20,33 ($\approx 8,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachweisen. Im Interface-Bereich zeigte sich eine hoch-signifikante Erhöhung der Alp1-Genexpression nach 7 Tagen. Diesbezüglich kam es beim Referenzieren auf die Kontrolle am 3. Tag zu einer hoch-signifikanten Wertsteigerung von 0,90 auf 10,52 ($\approx 11,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nach 7 Tagen zu einer hoch-signifikanten Alp-Erhöhung von 3,10 auf 10,52 ($\approx 3,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Im Bereich der Fibroblasten zeigte die multiple rhBMP7-Substitution mit einer Dosierung von 500 ng/ml am 7. Tag hoch-signifikante Alp1-Genexpressionserhöhungen. Bezugnehmend auf die unstimulierte Kontrolle am 3. Tag ergab sich eine Expressionssteigerung von 0,98 auf 5,51 ($\approx 5,6$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Unter

Referenzierung auf die Kontrolle nach 7 Tagen konnte eine hoch-signifikante Zunahme der Alp1-Expression von 0,28 auf 5,51 ($\approx 19,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) beobachtet werden.

3.4 Die Spp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Die Spp1-Genexpression nach einfacher und mehrfacher Stimulation mit rhBMP7 wird in den nachfolgenden Unterkapitel detailliert beschrieben. Dabei geht der erste Abschnitt auf die bereichsabhängigen Veränderungen und der zweite Abschnitt auf die zeitabhängigen Resultate ein. Im dritten Unterkapitel werden die dosisabhängigen Ergebnisse der Spp1-Genexpression erläutert.

3.4.1 Die bereichsabhängige Spp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Die **Abbildung 27** stellt die Auswirkungen der einfachen respektive mehrfachen rhBMP7-Substitution auf die Genexpression von Spp1 zeigen. Hier demonstrieren die oberen Grafiken die Veränderungen der Spp1-Expression im Osteoblasten-Bereich, wohingegen die mittleren Grafiken die Änderungen im Interface-Bereich und die unteren Grafiken die Erhöhungen oder Erniedrigungen der Spp1-Genexpression im Fibroblasten-Bereich abbilden.

Nach singularer rhBMP7-Stimulation kam es im Osteoblasten-Bereich für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag und in Bezugnahme zur Kontrolle am 3. Tag zu einer hoch-signifikanten Spp1-Erhöhung von 0,66 auf 1,92 (\approx 2,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Bei Referenzierung auf die Kontrolle am 7. Tag ergab sich eine hoch-signifikante Genexpressionssteigerung von 0,73 auf 1,92 (\approx 2,6-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Am 10. Tag der singulären Versuchsdurchführung zeigten sich für alle Konzentrationen signifikante Spp1-Levelreduktionen. So ergaben sich für die Konzentration von 100 ng/ml eine sehr signifikante Genexpressionsabnahme von 1,92 auf 1,02 (\approx 1,9-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag), für die Dosierung von 250 ng/ml eine hoch-signifikante Spp1-Erniedrigung von 1,92 auf 1,00 (\approx 1,9-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die Dosis von 500 ng/ml rBMP7 eine sehr signifikante Reduktion von 1,92 auf 1,04 (\approx 1,8-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Für die multiple Stimulation mit rhBMP7 zeigte sich für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag eine signifikante Spp1-Erhöhung von 0,92 auf 1,95 (\approx 2,1-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Weiterhin resultierte für den Osteoblasten-Bereich im multiplen Applikationsansatz eine sehr signifikante Reduktion des Spp1-Levels am Tag 7 für die Konzentration von 100 ng/ml. Für die Referenzierung zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag ergab sich hier eine Verminderung der Spp1-Genlevel von 1,95 auf 0,90 (\approx 2,2-fache Erniedrigung, im Vergleich

zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Für die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP7 ließ sich am 10. Tag der multiplen Versuchsdurchführung eine signifikante Reduktion der Spp1-Genexpression von 1,46 auf 0,82 ($\approx 1,8$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) nachweisen.

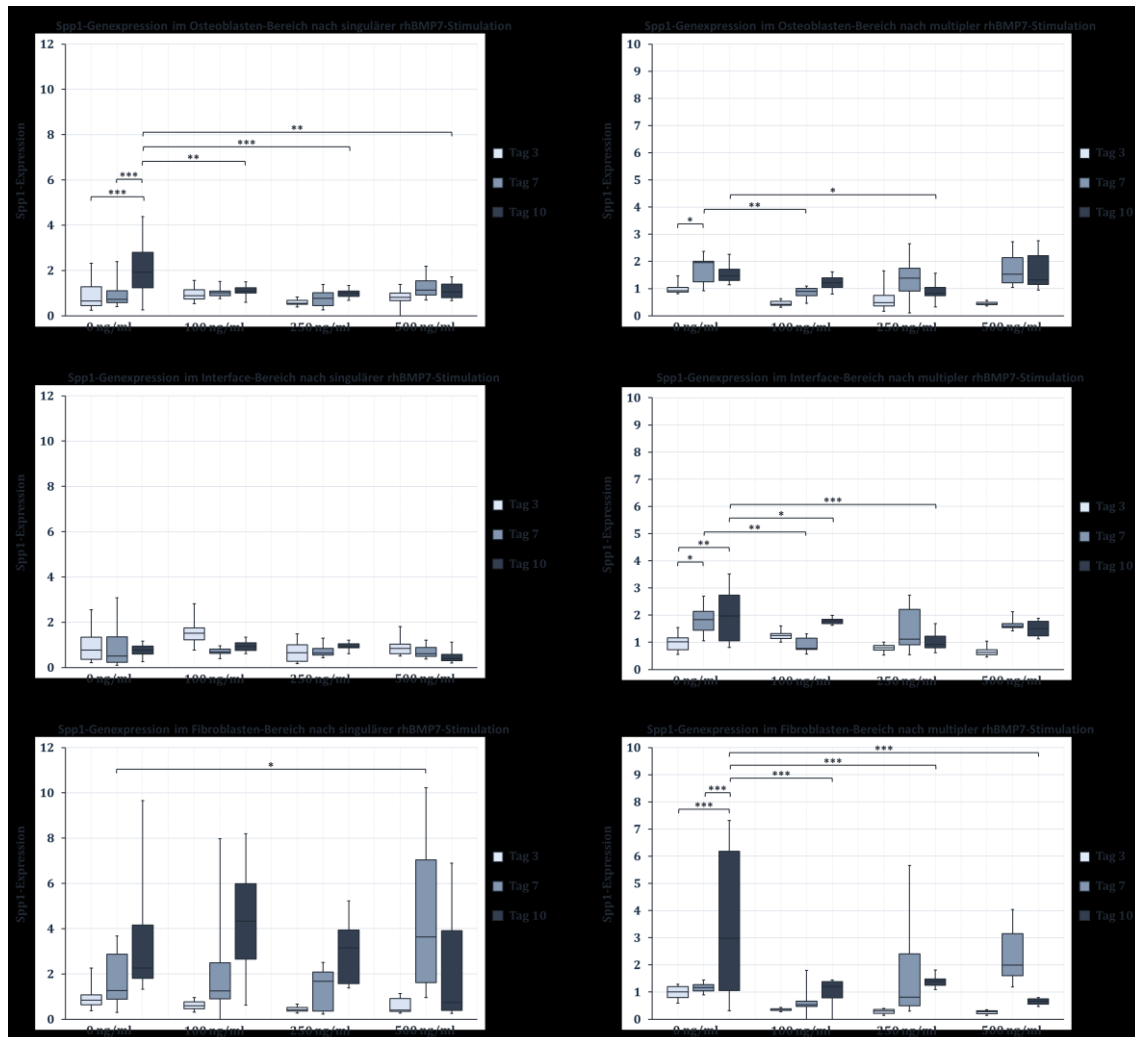


Abbildung 27: Bereichsabhängige Spp1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation ($n = 3$)

In Hinblick auf die singuläre Stimulation mit rhBMP7 zeigten sich im Interface-Bereich keine Auswirkungen auf die Spp1-Expression, wohingegen die multiple rhBMP7-Applikation sich in mehrere Spp1-Erhöhen beziehungsweise Spp1-Reduktionen auswirkte. Für die unstimulierten Kontrollen nach 7 Tagen beziehungsweise nach 10 Tagen resultierten einerseits eine signifikante Spp1-Erhöhung von 1,02 auf 1,84 ($\approx 1,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) für die Kontrolle am 7. Tag und andererseits eine sehr signifikante Steigerung von 1,02 auf 1,97 ($\approx 1,9$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) für die Kontrolle am 10. Tag. Nach 7 Tagen kam es im Interface-Bereich für die Konzentration von 100 ng/ml rhBMP7 zu einer

sehr signifikanten Spp1-Abnahme von 1,84 auf 0,78 (\approx 2,4-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Darüber hinaus zeigten sich auch nach 10 Tagen signifikante Verminderungen der Spp1-Genexpression. Hier ergaben sich für die Konzentration von 250 ng/ml eine signifikante Reduktion des Spp1-Genniveaus von 1,97 auf 1,78 (\approx 1,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die Konzentration von 500 ng/ml eine hoch-signifikante Spp1-Verminderung von 1,97 auf 0,92 (\approx 2,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Im Fibroblasten-Bereich ließ sich für die singuläre Stimulationsdurchführung, am Zeitpunkt 7 Tage und für die Konzentration von 500 ng/ml rhBMP7 eine signifikante Steigerung des Spp1-Levels von 1,26 auf 3,63 (\approx 2,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) nachweisen. In der mehrfachen Applikation von rhBMP7 kam es im Fibroblasten-Bereich für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag und bei Referenzierung zur Kontrolle am 3. Tag zu einer hoch-signifikante Spp1-Erhöhung mit einer Wertsteigerung von 1,00 auf 2,97 (\approx 3,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und beim Vergleich zur unstimulierten Kontrolle des 7. Tages zu einer Zunahme von 1,17 auf 2,97 (\approx 2,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Bezogen auf die Kontrolle zum 10. Tag ergaben sich in der multiplen rhBMP7-Zugabe im Fibroblasten-Bereich für alle untersuchten Stimulations-Konzentrationen hoch-signifikante Spp1-Reduktionen. So zeigte sich für die Konzentration von 100 ng/ml eine hoch-signifikante Spp1-Verminderung von 2,97 auf 1,21 (\approx 2,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag), für die Dosis von 250 ng/ml eine hoch-signifikante Genexpressionsabnahme von 2,97 auf 1,40 (\approx 2,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die Dosierung von 500 ng/ml eine hoch-signifikante Regression des Spp1-Levels von 2,97 auf 0,66 (\approx 4,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

3.4.2 Die zeitabhängige Spp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

In den drei Grafiken der **Abbildung 28** sind die Spp1-Genexpressionen nach singulärer respektive multipler Stimulation mit rhBMP7 und in Unterscheidung der unterschiedlichen Zeitpunkte der Kontrolluntersuchungen inklusive statistisch signifikanter Unterschiede dargestellt. Dabei stellen die oberen beiden Grafiken die Spp1-Expressionen nach 3 Tagen, die mittleren beiden Grafiken jene Genexpressionen am 7. Tag und die unteren beiden Grafiken die Expressionslevel nach 10 Tagen dar.

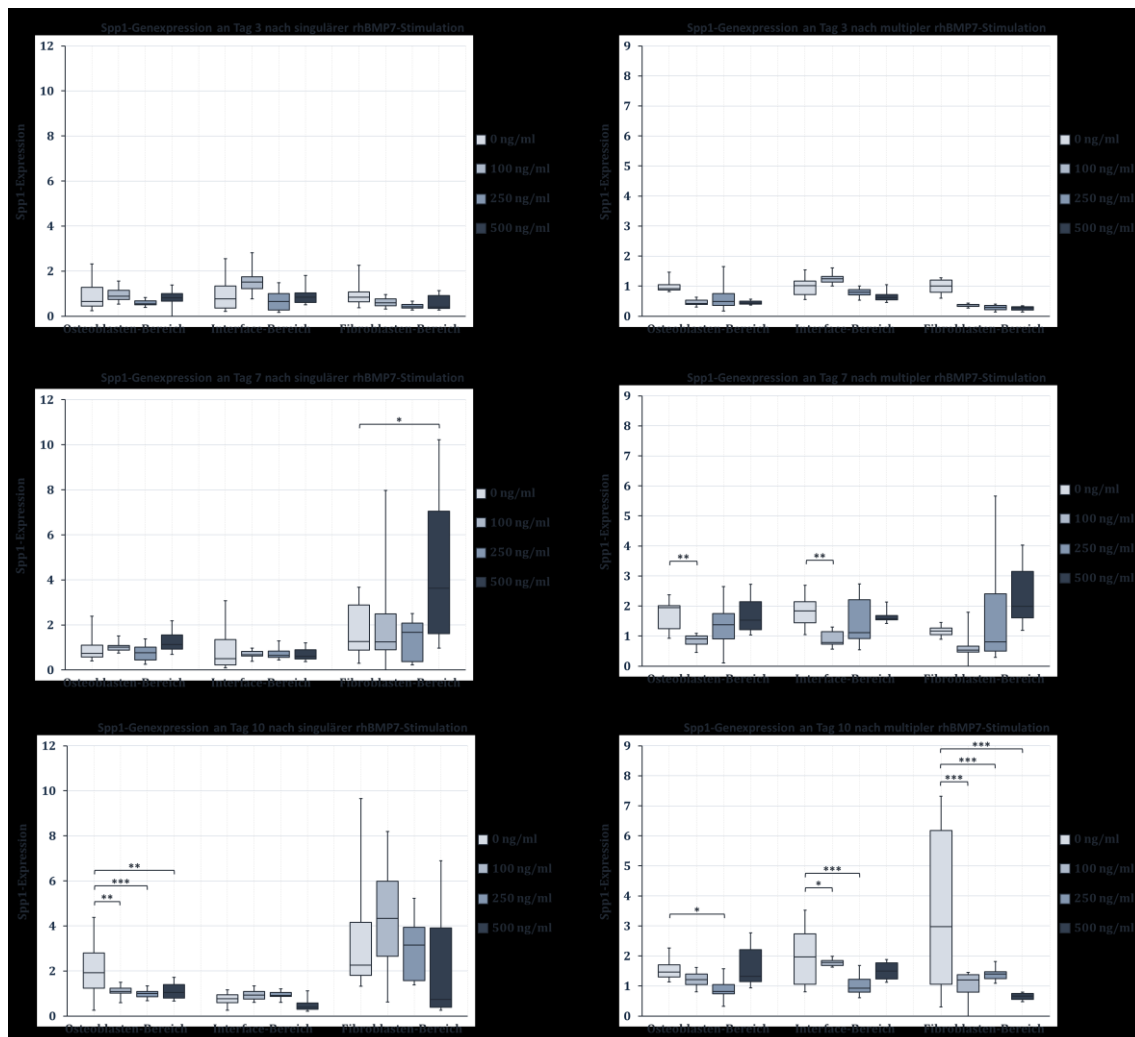


Abbildung 28: Zeitabhängige Spp1-Genexpression nach singularer und multipler rhBMP7-Stimulation (n = 3)

In Betrachtung der zeitabhängigen Veränderungen der Spp1-Genexpression am 3. Tag nach singularer rhBMP7-Stimulation zeigten sich weder im Osteoblasten-Bereich, noch im Interface-Bereich oder im Fibroblasten-Bereich signifikante Expressionsänderungen. Ebenso ließen sich für die mehrfache rhBMP7-Applikation am 3. Tag der Versuchsdurchführungen keine signifikanten Spp1-Erhöhungen oder Spp1-Erniedrigungen im Bereich der Osteoblasten, im Bereich der Fibroblasten oder im Bereich des Interfaces nachweisen.

Während sich nach 7 Tagen für den Versuchsansatz der singulären Stimulation mit rhBMP7 in einer Konzentration von 500 ng/ml im Fibroblasten-Bereich eine signifikante Steigerung der Spp1-Expression von 1,26 auf 3,63 ($\approx 2,9$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachweisen ließ, zeigten sich sowohl im Interface-Bereich als auch im Fibroblasten-Bereich keine signifikanten Spp1-Änderungen. Dem gegenüber konnten Veränderungen nach 7 Tagen multipler rhBMP7-Applikation

beobachtet werden. Hier zeigten sich sowohl im Osteoblasten-Bereich als auch im Fibroblasten-Bereich für die Konzentration von 100 ng/ml rhBMP7 signifikante Bglap-Erniedrigungen. Präziser formuliert resultierten hier eine sehr signifikante Wertreduktion von 1,95 auf 0,90 (\approx 2,2-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für den Osteoblasten-Bereich und eine sehr signifikante Bglap-Expressionsverminderung von 1,84 auf 0,78 (\approx 3,4-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für den Fibroblasten-Bereich. Eine wie im singulären Stimulationsversuch nachgewiesene Genexpressionserhöhung im Fibroblasten-Bereich nach 7 Tagen konnte nach multipler Applikation von rhBMP7 nicht beobachtet werden.

Nach 10 Tagen Versuchsdauer zeigten sich für die zeitabhängigen Spp1-Genexpression nach singulärer rhBMP7-Stimulation im Interface-Bereich und im Fibroblasten-Bereich keine signifikanten Veränderungen, nur im Osteoblasten-Bereich ließen sich signifikante Reduktionen dokumentieren. So ergaben sich für alle Konzentrationen am Tag 10 erniedrigte Spp1-Genlevel. Einerseits konnte für die Konzentration 100 ng/ml eine sehr signifikante Bglap-Reduktion von 1,92 auf 1,09 (\approx 1,8-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachgewiesen werden, andererseits fand sich für die Dosierung 250 ng/ml ein hoch-signifikanter Spp1-Regress von 1,92 auf 1,00 (\approx 1,9-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Desweiteren ergab sich für die rhBMP7-Konzentration von 500 ng/ml eine sehr signifikante Abnahme des Spp1-Levels von 1,92 auf 1,04 (\approx 1,8-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). In der multiplen rhBMP7-Applikation kam es in allen untersuchten Bereichen zu signifikanten Verminderungen der Spp1-Genexpression. So resultierte diesbezüglich im Osteoblasten-Bereich nach 10 Tagen multipler Zugabe von rhBMP7 für die Konzentration von 250 ng/ml eine signifikante Spp1-Reduktion von 1,46 auf 0,82 (\approx 1,8-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Im Interface-Bereich ergaben sich für die Konzentration 100 ng/ml rhBMP7 eine signifikante Abnahme der Spp1-Expression von 1,97 auf 1,78 (\approx 1,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die Dosierung von 250 ng/ml eine hoch-signifikante Spp1-Verringerung von 1,97 auf 0,92 (\approx 2,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Im Fibroblasten-Bereich zeigten sich für alle drei untersuchten Konzentrationen verringerte Spp1-Level nach 10-tägiger, multipler rhBMP7-Applikation. So ließen sich für die Dosierung von 100 ng/ml rhBMP7 eine hoch-signifikante Spp1-Abnahme von 2,97 auf 1,21 (\approx 2,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag), für die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP7 eine hoch-signifikante Reduktion von 2,97 auf 1,40 (\approx 2,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur

unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die rhBMP7-Dosierung von 500 ng/ml eine hoch-signifikante Verminderung von 2,97 auf 0,66 (\approx 4,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachweisen.

3.4.3 Die dosisabhängige Spp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Die **Abbildung 29** fasst die dosisabhängigen Auswirkungen der singulären rhBMP7-Applikation und der multiplen rhBMP7-Substitution auf die Expressionslevel von Spp1 grafisch zusammen. Dabei geben die oben angeordneten beiden Grafiken die Resultate für die Konzentration von 100 ng/ml rhBMP7 wieder, wohingegen die mittig angeordneten beiden Grafiken die Ergebnisse für die Dosierung von 250 ng/ml rhBMP7 zeigt. Die unten angeordneten beiden Grafiken demonstrieren die Veränderungen der Spp1-Expression für die Dosierung von 500 ng/ml rhBMP7.

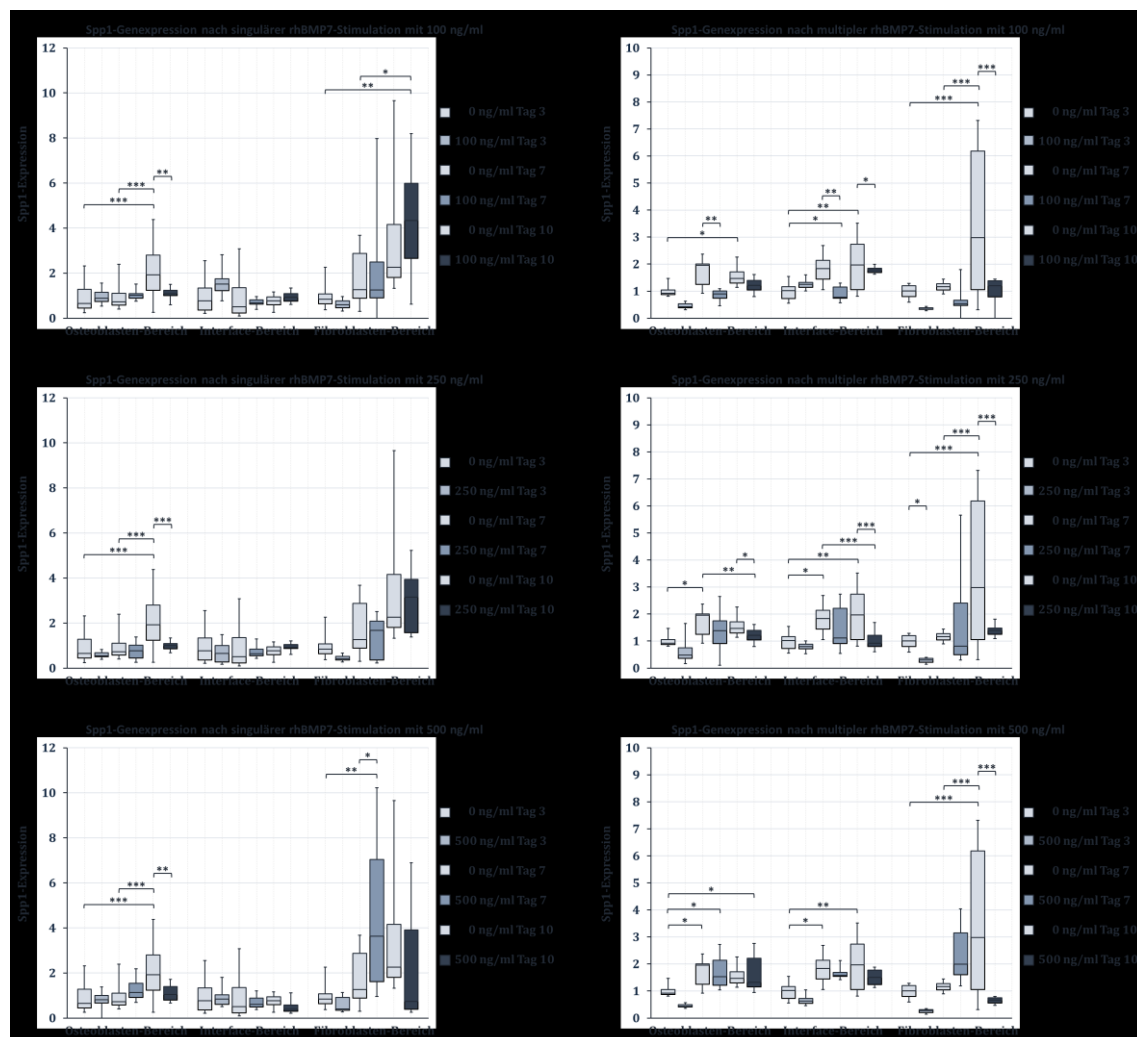


Abbildung 29: Dosisabhängige Spp1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation ($n = 3$)

Bezüglich der singulären Stimulation mit 100 ng/ml rhBMP7 zeigte sich im Osteoblasten-Bereich für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag ein signifikanter Spp1-Anstieg. So kam es in Relation zur Kontrolle am 3. Tag zur hoch-signifikanten Spp1-Zunahme von 0,66 auf 1,92 (\approx 2,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nach 7 Tagen zum hoch-signifikantem Genexpressionszuwachs von 0,73 auf 1,92 (\approx 2,6-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Darüber hinaus ließ sich für die Dosierung von 100 ng/ml nach 10 Tagen im Osteoblasten-Bereich auch eine sehr signifikante Reduktion der Spp1-Expression von 1,92 auf 1,09 (\approx 1,8-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachweisen. Während es im Interface-Bereich für die singuläre Stimulation mit 100 ng/ml rhBMP7 zu keiner signifikanten Veränderung der Spp1-Genexpression kam, zeigte sich im Fibroblasten-Bereich ein signifikanter Anstieg des besagten Genlevels nach 10 Tagen. Je nachdem, welche Kontrolle als Referenz verwendet wurde, resultierten einerseits eine sehr signifikante Spp1-Erhöhung von 0,84 auf 4,34 (\approx 5,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise andererseits eine signifikante Zunahme von 1,26 auf 4,34 (\approx 3,4-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Bezüglich der multiplen Applikation von rhBMP7 zeigten die Stimulationsversuche mehrere signifikante Erhöhungen und Erniedrigungen der Spp1-Genexpression. Im Osteoblasten-Bereich ließ sich für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag ein signifikanter Anstieg der Spp1-Expression von 0,92 auf 1,95 (\approx 2,1-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beobachten. Weiterhin kam es am 7. Tag und für die rhBMP7-Dosierung von 100 ng/ml zu einer sehr signifikanten Verminderung des Spp1-Levels von 1,95 auf 0,90 (\approx 2,2-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Im Interface-Bereich zeigten sich bei multipler rhBMP7-Applikation mit 100 ng/ml und für die unstimulierten Kontrollen sowohl am Tag 7 als auch am Tag 10 erhöhte Spp1-Expressionen. So ergaben sich einerseits eine signifikante Spp1-Erhöhung von 1,02 auf 1,84 (\approx 1,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) am 7. Tag und andererseits eine sehr signifikante Expressionserhöhung von 1,02 auf 1,97 (\approx 1,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) am 10. Tag. Darüber hinaus zeigten sich für die singuläre Stimulation mit 100 ng/ml nach 10 Tagen im Interface-Bereich sowohl eine sehr signifikante Spp1-Reduktion von 1,84 auf 0,78 (\approx 2,4-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) als auch eine signifikante Verminderung der Spp1-Expression von 1,97 auf 1,78 (\approx 1,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Im Fibroblasten-Bereich resultierte im multiplen Stimulationsansatz mit der Applikationsdosierung von 100

ng/ml nach 10 Tagen und in Relation zur unkontrollierten Kontrolle nach 3 Tagen ein hoch-signifikanter Anstieg der Spp1-Genexpression von 1,00 auf 2,97 (\approx 3,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beziehungsweise bei Referenzierung zur Kontrolle des 7. Tages zu einer Wertsteigerung der Spp1-Expression von 1,17 auf 2,97 (\approx 2,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag).

Für die singuläre rhBMP7-Stimulation mit 250 ng/ml ließen sich am 10. Tag im Osteblasten-Bereich hoch-signifikante Spp1-Steigerungen für die unstimulierten Kontrollen nachweisen. Hier ergaben sich einerseits bei Bezugnahme auf die Kontrolle am 3. Tag eine hoch-signifikante Zunahme der Spp1-Expression von 0,66 auf 1,92 (\approx 2,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nach 7 Tagen eine hoch-signifikante Spp1-Steigerung von 0,73 auf 1,92 (\approx 2,6-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Im Gegensatz zu den zuvor genannten Expressionszunahmen von Spp1 für die unstimulierten Kontrolle am Tag 10 zeigte sich zum gleichen Zeitpunkt im Osteblasten-Bereich für die multiple rhBMP7-Substitution in einer Dosierung von 250 ng/ml eine hoch-signifikante Reduktion der Spp1-Genexpression von 1,92 auf 1,00 (\approx 1,9-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Für besagte singuläre Stimulation mit 250 ng/ml rhBMP7 konnten keine signifikanten Veränderungen des Spp1-Genexpressionslevels im Bereich des Interfaces sowie im Fibroblasten-Bereich nachgewiesen werden. In der Betrachtung der mehrfachen Applikation von rhBMP7 in einer Dosierung von 250 ng/ml kam es in allen drei untersuchten Bereichen zu signifikanten Unterschieden in der Expression von Spp1. Für den Osteblasten-Bereich ließ sich diesbezüglich für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag eine signifikante Zunahme der Spp1-Genexpression von 0,92 auf 1,95 (\approx 2,1-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) nachweisen. Darüber hinaus resultierte einerseits im Vergleich zur Kontrolle am 7. Tag eine sehr signifikante Spp1-Verringerung von 1,95 auf 1,21 (\approx 1,6-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) für die multiple Stimulation mit 250 ng/ml am 10. Tag, andererseits ergab sich bezogen auf die Kontrolle am 10. Tag eine signifikante Reduktion des Spp1-Levels von 1,46 auf 1,21 (\approx 1,2-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Für den Interface-Bereich konnte nach multipler Stimulation mit rhBMP7 in einer Dosierung von 250 ng/ml für die unstimulierte Kontrolle nach 7 Tagen eine signifikante Reduktion des Spp1-Expressionsniveaus von 1,02 auf 1,84 (\approx 1,8-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) beobachtet werden. Auch am 10. Tag der Versuchsdurchführung zeigte die Kontrolle eine sehr signifikante Abnahme des Spp1-

Levels von 1,02 auf 1,97 (\approx 1,9-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Für die Stimulation mit 250 ng/ml ließen sich am 10. Tag der Versuchsdurchführungen im Interface-Bereich hoch-signifikante Spp1-Reduktionen beobachten, die im Vergleich zur Kontrolle am 7. Tag zu einer Wertreduktion von 1,84 auf 1,92 (\approx 2-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und unter Bezugnahme zur unstimulierten Kontrolle des 10. Tages zu einem Wertverlust von 1,97 auf 0,92 (\approx 2,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) führten. Für den Bereich der Fibroblasten zeigten sich ebenfalls signifikante Spp1-Expressionsänderungen. Hier ergaben sich im Rahmen der multiplen rhBMP7-Stimulation mit einer Einzeldosis von 250 ng/ml signifikante Reduktionen des Spp1-Levels. So fand sich einerseits am 3. Tag für die Konzentration von 250 ng/ml eine signifikante Abnahme der Spp1-Expression von 1,00 auf 0,29 (\approx 3,4 -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits nach 10 Tagen die hoch-signifikante Spp1-Reduktion von 2,97 auf einen Wert von 1,40 (\approx 2,1-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Im Gegensatz dazu zeigten sich für die unstimulierte Kontrolle im Fibroblasten-Bereich am Zeitpunkt 10 Tage hoch-signifikante Expressionssteigerungen in Bezug auf Spp1. Bezogen auf die Kontrolle am 3. Tag resultierte eine hoch-signifikante Spp1-Zunahme von 1,00 auf 2,97 (\approx 3,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), wohingegen der Vergleich zur Kontrolle am 7. Tag eine hoch-signifikante Wertesteigerung von 1,17 auf 2,97 (\approx 2,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) bedeutete.

Für die singuläre als auch multiple rhBMP7-Applikation mit einer rhBMP7-Dosierung von 500 ng/ml ließen sich signifikante Veränderungen der Genexpression von Spp1 beobachten. Beginnend mit dem Osteoblasten-Bereich im Rahmen der singulären Stimulation zeigten sich hoch-signifikante Erhöhungen der Spp1-Genexpression für die unstimulierte Kontrolle nach 10 Tagen. Hier ergaben sich einerseits eine hoch-signifikante Zunahme des Spp1-Expressionsniveaus von 0,66 auf 1,92 (\approx 2,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) im Vergleich zur Kontrolle am 3. Tag und andererseits eine hoch-signifikante Spp1-Levelsteigerung von 0,73 auf 1,92 (\approx 2,6-fache Erhöhung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) in Relation zur unstimulierten Kontrolle nach 7 Tagen. Für die wiederholte Stimulation mit 500 ng/ml rhBMP7 kam es am 10. Tag zu einem sehr signifikanten Abfall der Spp1-Expression von 1,92 auf 1,04 (\approx 1,8-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Während sich für den Interface-Bereich bezüglich der multiplen rhBMP7-Substitution mit 500 ng/ml keine signifikanten Änderungen bezüglich des Spp1-Genexpressionsniveaus

nachweisen ließen, resultierte für den Bereich der Fibroblasten eine signifikante Erhöhung des Spp1-Levels am 7. Tag der Versuchsdurchführung. Während sich in Bezug auf die unstimulierte Kontrolle des 3. Tages eine sehr signifikante Spp1-Zunahme von 0,84 auf 3,63 (\approx 4,3-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) fand, kam es bei Verwendung der Kontrolle am 7. Tag als Referenzwert zu einer signifikanten Spp1-Steigerung von 1,26 auf 3,63 (\approx 2,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Im multiplen Stimulationsansatz mit der Dosierung von 500 ng/ml rhBMP7 konnten für alle untersuchten Bereichen signifikanten Spp1-Expressionsveränderungen gefunden werden. Im Osteoblasten-Bereich zeigte sich für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag eine signifikante Spp1-Zunahme von 0,92 auf 1,95 (\approx 2,1-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Darüber hinaus ließen sich signifikante Spp1-Erhöhungen für die multiple Stimulation mit 500 ng/ml am 7. Tag und am 10. Tag der Versuchsdauer beobachten. Hier ergaben sich einerseits für den 7. Tag eine signifikante Spp1-Steigerung von 0,92 auf 1,52 (\approx 1,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits am 10. Tag eine signifikante Genexpressionserhöhung von 0,92 auf 1,32 (\approx 1,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Im Interface-Bereich ließ sich im Rahmen der multiplen Stimulation mit 500 ng/ml eine signifikante Steigerung des Spp1-Expressionsniveaus zu den Kontrollpunkten nachweisen. Auf der einen Seite konnte für die unstimulierte Kontrolle am 7. Tag eine signifikante Spp1-Erhöhung von 1,02 auf 1,84 (\approx 1,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) nachgewiesen werden, auf der anderen Seite fand sich für die Kontrolle am 10. Tag eine sehr signifikante Expressionszunahme von 1,02 auf 1,97 (\approx 1,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Im Bereich der Fibroblasten zeigten sich drei signifikante Änderungen der Spp1-Expression. So ließ sich im multiplen Stimulationsansatz für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag unter Bezugnahme auf die Kontrolle am 3. Tag eine hoch-signifikante Zunahme der Spp1-Genexpression von 1,00 auf 2,97 (\approx 3,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) nachweisen, wohingegen im Vergleich zur Kontrolle des 7. Tages eine hoch-signifikante Spp1-Steigerung von 1,17 auf 2,97 (\approx 2,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) zu beobachten war. Des Weiteren kam es unter multipler Stimulation mit 500 ng/ml rhBMP7 am 10. Tag der experimentellen Untersuchung zu einer hoch-signifikanten Abnahme des Spp1-Expressionsniveaus von 2,97 auf 0,66 (\approx 4,5-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

3.5 Die Bglap-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Die Veränderungen der Bglap-Genexpression im Anschluss an die singuläre respektive multiple rhBMP7-Stimulation werden in den drei nachfolgenden Unterkapiteln beschrieben.

3.5.1 Die bereichsabhängige Bglap-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

In der **Abbildung 30** sind die Auswirkungen der einfachen respektive mehrfachen rhBMP7-Substitution auf die Bglap-Genexpression dargestellt, wobei die oberen Grafiken die Expressionen im Osteoblasten-Bereich, die mittleren Grafiken die Änderungen der Bglap-Level im Interface-Bereich und die unten Grafiken die Erhöhungen oder Erniedrigungen der besagten Genexpression im Fibroblasten-Bereich widerspiegeln.

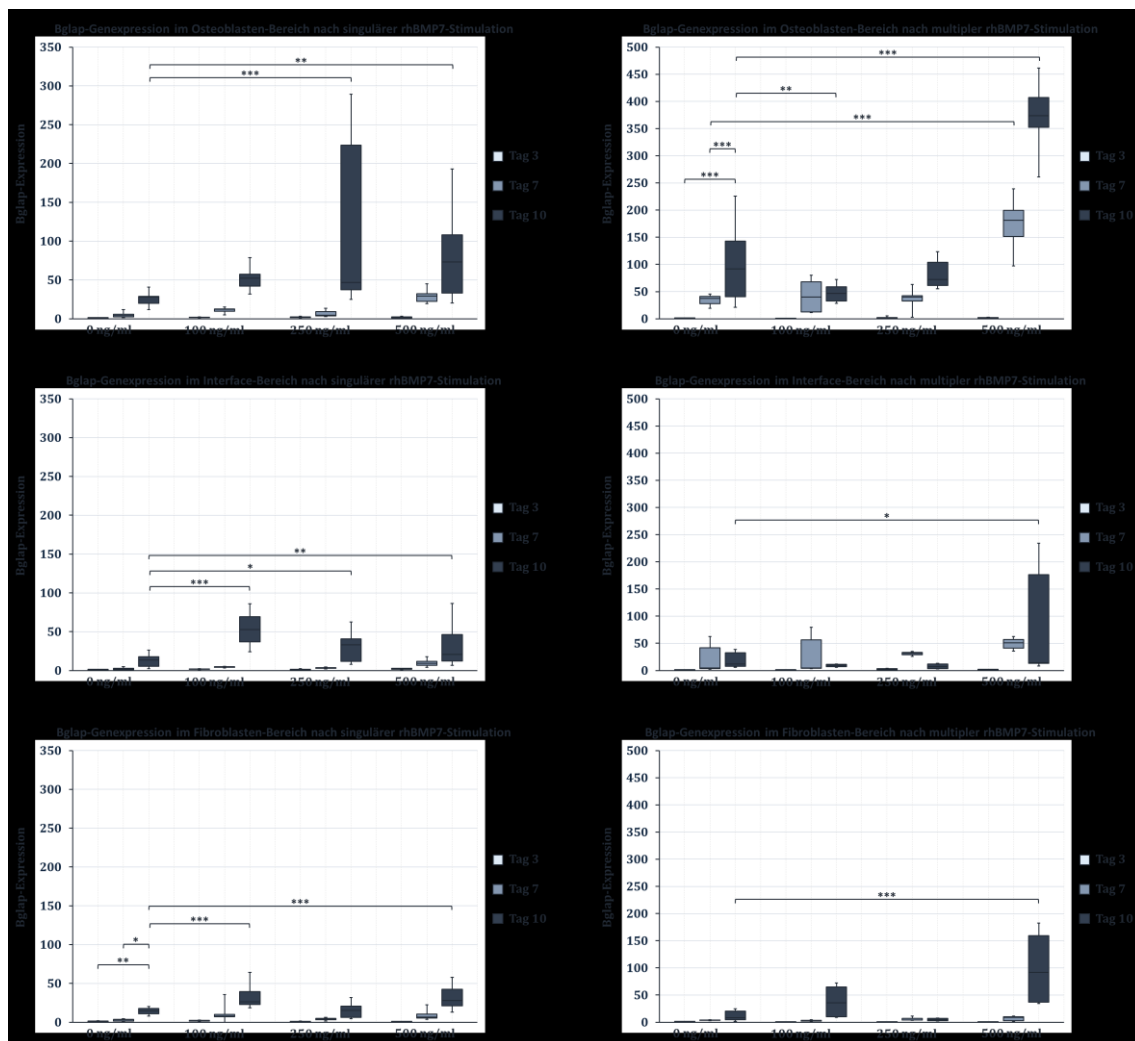


Abbildung 30: Bereichsabhängige Bglap-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation (n = 3)

Im Bereich der Osteoblasten zeigten sich nach 10 Tagen der singulären rhBMP7-Stimulation signifikante Erhöhungen der Bglap-Genexpressionen. Hier kam es einerseits für die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP7 zu einer hoch-signifikanten Bglap-Levelsteigerung von 27,80 auf 46,89 ($\approx 1,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und andererseits für die Dosierung mit 500 ng/ml rhBMP7 zu einer signifikanten Expressionszunahme von Bglap mit einer Werterhöhung von 27,80 auf 73,04 ($\approx 2,6$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Ebenso zeigten sich im Osteoblasten-Bereich nach multipler rhBMP7-Applikation mehrfache Expressionssteigerungen sowie eine einzelne Genexpressionsreduktion für Bglap. Für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag ergaben sich eine hoch-signifikante Bglap-Genexpressionserhöhungen. Während bezogen auf die Kontrolle am 3. Tag eine hoch-signifikanten Wertsteigerung von 1,06 auf 91,79 ($\approx 86,6$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) resultierte, fand sich bei Verwendung der Kontrolle nach 7 Tagen eine ebenso hoch-signifikante Bglap-Erhöhung von 37,76 auf 91,79 ($\approx 2,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag).

Am 7. Tag nach multipler rhBMP7-Stimulation ergab sich im Osteoblasten-Bereich für die Konzentration von 250 ng/ml eine hoch-signifikante Bglap-Zunahme von 37,76 auf 181,29 ($\approx 4,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Während sich für die Dosierung von 100 ng/ml nach 10 Tagen eine sehr signifikante Bglap-Reduktion von 91,79 auf 46,92 ($\approx 2,0$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) ergab, ließ sich für die Konzentration von 500 ng/ml ein hoch-signifikanter Progress der Bglap-Genexpression mit einer Steigerung von 91,79 auf 373,97 ($\approx 4,1$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachweisen.

Im Interface-Bereich zeigten sich im Rahmen der einfachen rhBMP7-Zugabe erst nach 10 Tagen expressionsverstärkende Auswirkungen. So kam es am Tag 10 für die Konzentration von 100 ng/ml zu einer hoch-signifikanten Bglap-Expressionszunahme von 13,49 auf 52,82 ($\approx 3,9$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag), für die Dosierung von 250 ng/ml zu einer signifikanten Genlevelerhöhung von 13,49 auf 33,03 ($\approx 2,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die rhBMP7-Konzentration von 500 ng/ml zu einem sehr signifikanten Anstieg der Bglap-Expression von 13,49 auf 20,62 ($\approx 1,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Bei Betrachtung der Bglap-Genexpression im Interface-Bereich nach multipler rhBMP7-Applikation zeigte sich nur eine singuläre signifikante Änderung. Hier kam es für die Konzentration von 500 ng/ml rhBMP7 am 10. Tag zu einer sehr signifikanten

Bglap-Erhöhung von 12,04 auf 14,31 (\approx 1,2-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

Im Fibroblasten-Bereich resultierte bei der Betrachtung der singulären rhBMP7-Stimulationsversuche für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag eine signifikante Expressionssteigerung von Bglap. Genauer gesagt konnte diesbezüglich eine sehr signifikante Bglap-Zunahme von 1,00 auf 14,70 (\approx 14,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) in Bezugnahme auf die Kontrolle am 3. Tag respektive eine signifikante Bglap-Expressionserhöhung von 3,14 auf 14,70 (\approx 4,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nach 7 Tagen beobachtet werden. Weiterhin ließen sich am 10. Tag der singulären rhBMP7-Stimulation hoch-signifikante Bglap-Expressionssteigerung nachweisen. Hier kam es einerseits für die Dosierung von 100 ng/ml rhBMP7 zu einer hoch-signifikanten Zunahme des Bglap-Levels von 14,70 auf 26,26 (\approx 1,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und andererseits für die Konzentration 500 ng/ml zu einem hoch-signifikanten Anstieg der Expression von 14,70 auf 27,96 (\approx 1,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Im Rahmen der mehrfachen Hinzugabe von rhBMP7 ließ sich im Fibroblasten-Bereich nach einer Versuchsdauer von 10 Tagen und für die rhBMP7-Konzentration von 500 ng/ml eine hoch-signifikante Erhöhung der Bglap-Genexpression mit einer Wertsteigerung von 7,98 auf 91,93 (\approx 11,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachweisen.

3.5.2 Die zeitabhängige Bglap-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Die Bglap-Genexpressionen zu den untersuchten Zeitpunkten und nach Durchführung der singulären und multiplen Stimulation mit rhBMP7 sind grafisch in der nachfolgenden **Abbildung 31** visualisiert. In dieser Abbildung stellen die oben angeordneten beiden Grafiken die Änderungen der Bglap-Genexpression nach 3 Tagen dar, wohingegen die mittig angeordneten beiden Grafiken die Resultate der Bglap-Genexpression nach 7 Tagen erfassen. Die Bglap-Expressionslevel am 10. Tag nach singulärer und multipler rhBMP7-Applikation sind in den beiden unten angeordneten Grafiken der zuvor genannten Abbildung dargestellt.

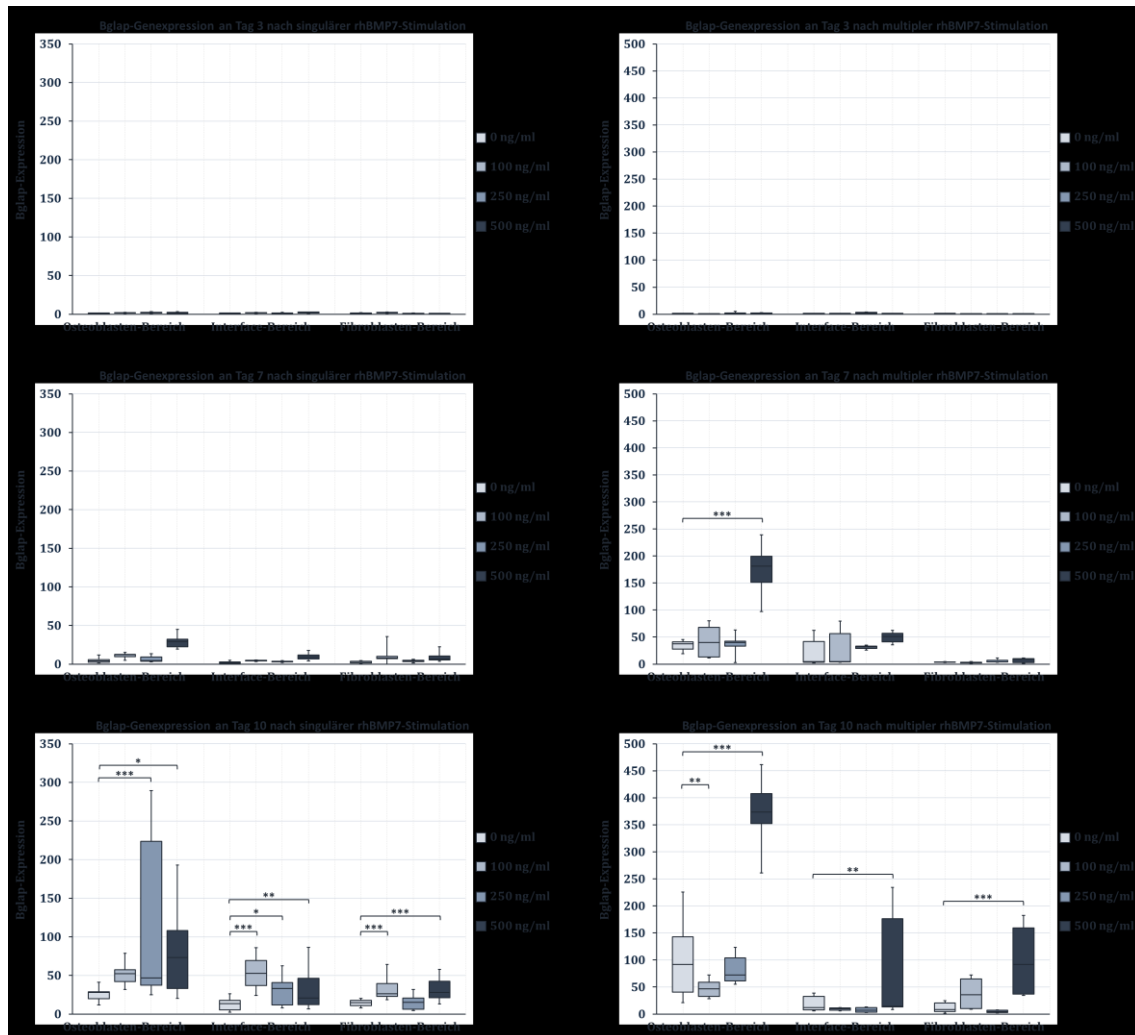


Abbildung 31: Zeitabhängige Bglap-Genexpression nach singularer und multipler rhBMP7-Stimulation (n = 3)

Für die zeitabhängigen Bglap-Genexpression nach 3 Tagen im Rahmen der singularen rhBMP7-Stimulationsversuche ließen sich weder im Osteoblasten-Bereich noch im Interface-Bereich oder im Fibroblasten-Bereich signifikante Veränderungen beobachten. Parallel zu diesem Ergebnis konnten auch am 3. Tag der multiplen rhBMP7-Applikation keine signifikanten Bglap-Genleveländerungen in allen untersuchten Bereichen nachgewiesen werden.

Am 7. Tag der Versuchsdurchführung kam es nach singularer rhBMP7-Substitution zu keinen signifikanten Erhöhungen oder Erniedrigungen im Osteoblasten-Bereich, im Interface-Bereich oder im Fibroblasten-Bereich. In Betrachtung der mehrfachen rhBMP7-Zugabe zeigten sich im Interface-Bereich und im Fibroblasten-Bereich ebenfalls keine Veränderungen der Bglap-Expression, jedoch kam es für die Konzentration von 500 ng/ml rhBMP7 am 7. Tag im Osteoblasten-Bereich zu einer hoch-signifikanten Bglap-

Genexpressionszunahme von 37,76 auf 181,29 (\approx 4,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag).

Im Rahmen der Analyse der Bglap-Modifikation nach 10 Tagen ließen sich im Osteoblasten-Bereich neben einer hoch-signifikanten Bglap-Erhöhung von 27,80 auf 46,89 (\approx 1,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) für die Dosierung von 250 ng/ml auch für die Konzentration von 500 ng/ml eine signifikante Zunahme der Bglap-Genexpression beobachten, wobei hier ein Wertanstieg von 27,80 auf 73,04 (\approx 2,6-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) registriert wurde. Für die zuvor genannte singuläre rhBMP7-Stimulation zeigten sich nach 10 Tagen auch im Interface-Bereich Bglap-Expressionssteigerungen. Hier kam es in Bezug auf die Konzentration von 100 ng/ml zu einer hoch-signifikanten Bglap-Erhöhung von 13,49 auf 52,82 (\approx 3,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag), für die Dosierung von 250 ng/ml zu einer signifikanten Zunahme der Bglap-Expression von 13,49 auf 33,03 (\approx 2,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die Konzentration von 500 ng/ml rhBMP7 zu einem sehr signifikanten Genexpressionszuwachs von Bglap von 13,49 auf 20,62 (\approx 1,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Desweiteren ließ sich der expressionsfördernde Effekt der multiplen rhBMP7-Stimulation nach 10 Tagen auch im Bereich der Fibroblasten nachweisen. Hier resultierten für die Dosierung von 100 ng/ml eine hoch-signifikante Zunahme von Bglap von 14,70 auf 26,26 (\approx 1,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) und für die Konzentration von 500 ng/ml eine hoch-signifikante Bglap-Genexpressionssteigerung von 14,70 auf 27,94 (\approx 1,9-fache Erhöhung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Auch die multiple rhBMP7-Applikation zeigte nach 10 Tagen überwiegend förderliche Auswirkungen des rhBMP7s auf die Bglap-Expression. Während es im Osteoblasten-Bereich für die mehrfache rhBMP7-Stimulation und für die Konzentration von 100 ng/ml am 10. Tag der Versuchsdurchführung zu einer sehr signifikanten Reduktion des Bglap-Levels von 91,79 auf 46,92 (\approx 2,0-fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) kam, ergab sich für die Dosierung von 500 ng/ml eine hoch-signifikante Erhöhung der Expressionsniveaus von 91,79 auf 373,97 (\approx 4,1-fache Erhöhung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Im Interface-Bereich ließ sich für die mehrfache rhBMP7-Zugabe nach 10 Tagen und für die rhBMP7-Konzentration von 500 ng/ml eine sehr signifikante Bglap-Erhöhung von 12,04 auf 14,32 (\approx 1,2-fache Erhöhung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachweisen. Für diese Dosierung mit 500 ng/ml rhBMP7 ergab sich auch im Fibroblasten-Bereich eine signifikante Bglap-Zunahme. So kam es nach 10 Tagen multipler

Stimulation zu einer hoch-signifikanten Steigerung des Bglap-Niveaus, wobei eine Werteerhöhung von 7,98 auf 91,93 ($\approx 11,5$ -fache Erhöhung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) zu beobachten war.

3.5.3 Die dosisabhängige Bglap-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

In der nachfolgenden **Abbildung 32** sind die dosisabhängigen Auswirkungen der einfachen rhBMP7-Applikation und der mehrfachen Stimulation mit rhBMP7 auf die Genexpression von Bglap abgebildet. Dabei stellen die oberen Grafiken die Ergebnisse für die Dosierung von 100 ng/ml dar, wohingegen die mittleren Grafiken und die unteren Grafiken die Erhöhungen oder Reduktionen der Bglap-Genexpression bei Stimulation mit 250 ng/ml rhBMP7 beziehungsweise mit 500 ng/ml rhBMP7 zeigen.

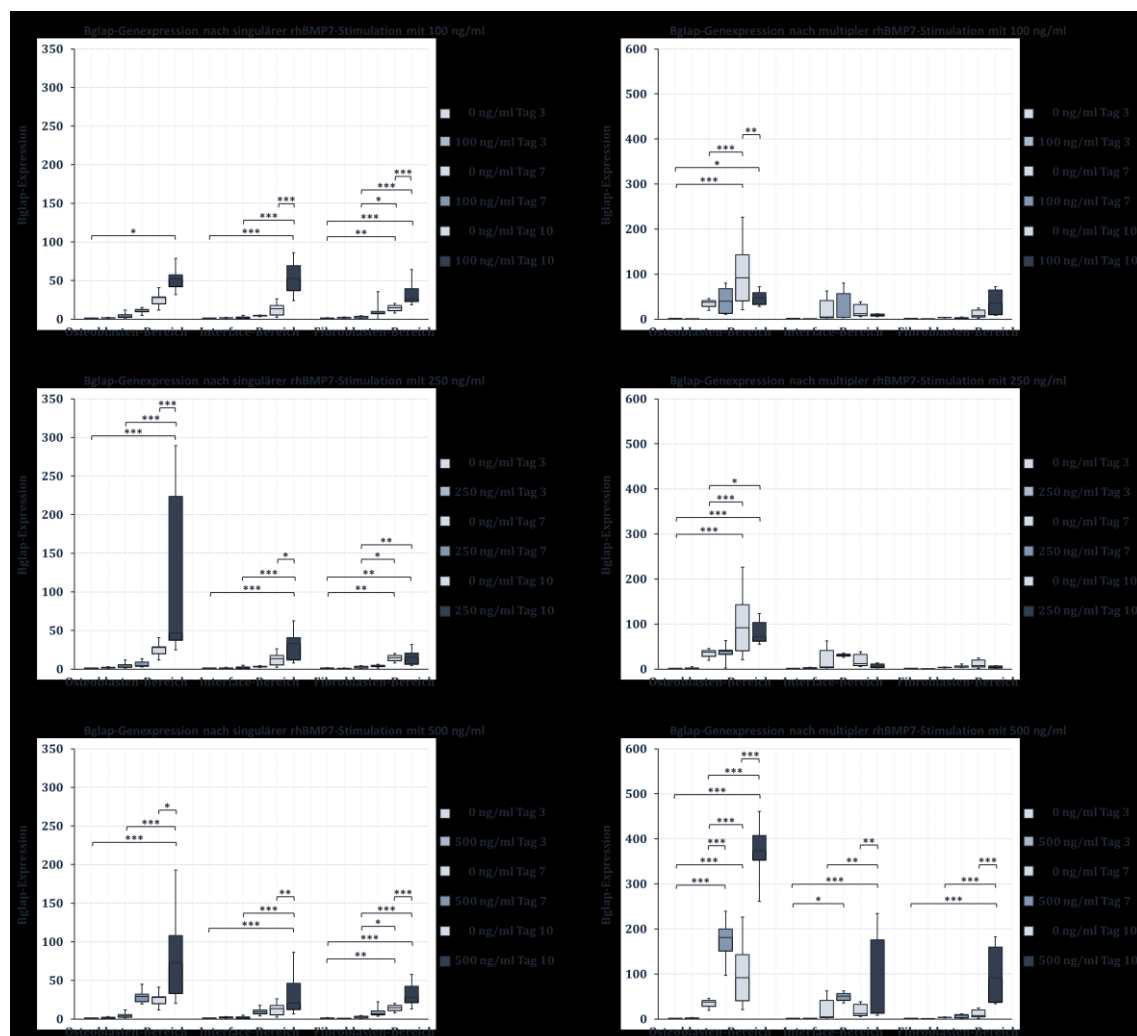


Abbildung 32: Dosisabhängige Bglap-Genexpression nach singularer und multipler rhBMP7-Stimulation ($n = 3$)

Für die singuläre Stimulation mit 100 ng/ml rhBMP7 zeigte sich im Osteoblasten-Bereich nur eine einzelne, signifikante Veränderung. Hier ergab sich am 10. Tag der singulären rhBMP7-Applikation eine signifikante Bglap-Erhöhung von 0,98 auf 52,26 (\approx 53,3-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Für den Interface-Bereich kam es zu einer hoch-signifikanten Erhöhung der Bglap-Genexpression nach 10 Tagen. Je nachdem, welche Kontrolle zum Vergleich herangezogen werden, ergaben sich hier unterschiedliche Wertesteigerungen. Einerseits kam es in Bezugnahme zur Kontrolle am 3. Tag zur hoch-signifikanten Bglap-Expressionszunahme von 0,97 auf 52,82 (\approx 54,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits beim Vergleich zur unstimulierten Kontrolle des 7. Tages zu einer hoch-signifikanten Erhöhung des Bglap-Expressionsniveaus von 1,76 auf 52,82 (\approx 30,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Bei Referenzierung auf die Kontrolle nach 10 Tagen konnte eine hoch-signifikante Wertsteigerung von 14,49 auf 52,82 (\approx 3,6-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Veränderungen im Fibroblasten-Bereich nach singulärer Stimulation mit 100 ng/ml rhBMP7 ließen sich unterschiedliche Aussagen treffen. So kam es im Bereich der Fibroblasten für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag zu einer signifikanten Erhöhung des Bglap-Expressionsniveaus. Präziser formuliert, resultierte im Vergleich zur Kontrolle am 3. Tag eine sehr signifikante Bglap-Erhöhung von 1,00 auf 14,70 (\approx 14,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag). Bezogen auf die Kontrolle nach 7 Tagen ergab sich eine signifikante Bglap-Steigerung von 3,14 auf 14,70 (\approx 4,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Darüber hinaus zeigten die experimentellen Daten für die singuläre Stimulation mit 100 ng/ml auch nach 10 Tagen Versuchsdurchführung positive Auswirkungen auf die Bglap-Genexpression. So konnte im Fibroblasten-Bereich einerseits bezogen auf die Kontrolle am 3. Tag eine hoch-signifikante Bglap-Steigerung von 1,00 auf 26,26 (\approx 26,3-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) dokumentiert und andererseits bei Referenzierung zur Kontrolle am 7. Tag eine hoch-signifikante Expressionszunahme von 3,14 auf 26,26 (\approx 8,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) beobachtet werden. Bei Verwendung der Kontrolle am 10. Tag resultierte eine hoch-signifikante Progression des Bglap-Levels von 14,70 auf 26,26 (\approx 1,8-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). In Betrachtung der Bglap-Expression nach multipler Applikation von 100 ng/ml rhBMP7 ergaben sich weder im Interface-Bereich noch im Fibroblasten-Bereich signifikante Änderungen, wohingegen jedoch signifikante Bglap-Steigerungen für den Osteoblasten-Bereich nachweisbar waren. In besagtem Osteoblasten-Bereich kam es für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag zu einer hoch-signifikanten

Zunahme der Bglap-Genexpression, so dass sich im Vergleich zur Kontrolle nach 3 Tagen eine hoch-signifikante Bglap-Erhöhung von 1,06 auf 91,79 ($\approx 86,6$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und unter Bezugnahme auf die Kontrolle am 7. Tag ein hoch-signifikanter Zuwachs von 37,76 auf 91,79 ($\approx 2,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) zeigte. Weiterhin ergab sich für die multiple Applikation von 100 ng/ml rhBMP7 nach 10 Tagen einerseits beim Vergleich zur Kontrolle am 3. Tag eine signifikante Bglap-Erhöhung von 1,06 auf 46,92 ($\approx 44,3$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits bei Referenzierung zur Kontrolle am 10. Tag eine sehr signifikante Reduktion der Bglap-Expression von 91,79 auf 46,92 ($\approx 4,7$ -fache Erniedrigung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

In den einfachen Stimulationsversuchen mit 250 ng/ml rhBMP7 zeigten sich in allen untersuchten Bereichen signifikante Bglap-Genexpressionserhöhungen. Im Osteoblasten-Bereich ließen sich für die zuvor genannte Dosierung am 10. Tag der Versuchsdauer hoch-signifikante Expressionszunahmen verzeichnen. So kam es einerseits im Vergleich zur Kontrolle am 3. Tag zu einer hoch-signifikanten Steigerung von 0,98 auf 46,89 ($\approx 47,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits in Relation zur Kontrolle am 7. Tag zu einem hoch-signifikanten Bglap-Zuwachs von 4,04 auf 46,89 ($\approx 11,6$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Bei Verwendung der Kontrolle am 10. Tag als Bezugspunkt ergab sich eine hoch-signifikante Expressionszunahme von 27,80 auf 46,89 ($\approx 1,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). In der Betrachtung des Interface-Bereiches kam es zu vergleichbaren Bglap-Expressionsänderungen wie im Osteoblasten-Bereich. So zeigte sich im Interface-Bereich für die singuläre rhBMP7-Stimulation mit der Dosierung von 250 ng/ml eine hoch-signifikante Bglap-Erhöhung von 0,97 auf 33,03 ($\approx 34,1$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) in Bezugnahme zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag. Bei Referenzierung zur Kontrolle des 7. Tages und 10. Tages ergaben sich für besagte singuläre Stimulation mit 250 ng/ml rhBMP7 einerseits eine hoch-signifikante Expressionszunahme von 1,76 auf 33,03 ($\approx 18,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und andererseits eine signifikante Bglap-Steigerung von 13,49 auf 33,03 ($\approx 2,4$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Je nachdem, ob die Kontrolle am 7. Tag oder am 10. Tag zugrunde gelegt wurde, ließen sich im Fibroblasten-Bereich für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag der Versuchsdurchführung einerseits eine sehr signifikante Bglap-Genexpressionserhöhung von 1,00 auf 14,70 ($\approx 14,7$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur

unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits ein Bglap-Level-Anstieg von 3,14 auf 14,70 (\approx 4,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) nachweisen. Weiterhin zeigten sich im Fibroblasten-Bereich nach singulärer rhBMP7-Applikation in einer Konzentration von 250 ng/ml signifikante Steigerungen am 10. Tag der Stimulation. Hier ergaben sich einerseits in Relation zur unstimulierten Kontrolle des 3. Tages ein sehr signifikanter Bglap-Zuwachs von 1,00 auf 15,29 (\approx 15,3-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits im Vergleich zur Kontrolle am 7. Tag eine sehr signifikante Bglap-Expressionszunahme von 3,14 auf 15,29 (\approx 4,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). In Betrachtung der Veränderung nach repetitiver Stimulation der Zellen in den untersuchten Bereichen mit rhBMP7 in der Konzentration von 250 ng/ml ließen sich wie in den singulären Versuchsanordnungen durchgehend steigernde Effekte auf die Bglap-Expression beobachten. Für die unstimulierte Kontrolle nach 10 Tagen resultierte im Osteoblasten-Bereich eine hoch-signifikante Steigerung der Bglap-Genexpression, wobei es diesbezüglich unter Berücksichtigung der Kontrolle am 3. Tag zu einer hoch-signifikanten Zunahme von 1,06 auf 91,79 (\approx 86,6-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und in Bezug auf die Kontrolle nach 7 Tagen zu einer ebenfalls hoch-signifikanten Steigerung des Bglap-Levels von 37,76 auf 91,79 (\approx 2,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) kam. Für die repetitive Stimulation mit 250 ng/ml rhBMP7 ließen sich darüber hinaus eine im Vergleich zur Kontrolle am 3. Tag hoch-signifikante Bglap-Erhöhung von 1,06 auf 72,23 (\approx 68,1-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und eine in Relation zur Kontrolle des 7. Tages signifikante Steigerung des Bglap-Expressionsniveaus von 37,76 auf 72,23 (\approx 1,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) nachweisen. Bezogen auf die multiple Stimulation mit 250 ng/ml rhBMP7 ergaben sich sowohl im Interface-Bereich als auch im Fibroblasten-Bereich keine signifikanten Erhöhungen oder Verminderungen der untersuchten Bglap-Genexpression.

Für die einmalige Applikation von 500 ng/ml rhBMP7 kam es im Osteoblasten-Bereich nach 10 Tagen zu signifikanten Erhöhungen der Bglap-Expression. So ließ sich in Bezugnahme auf die unstimulierte Kontrolle am 3. Tag eine hoch-signifikante Expressionssteigerung von 0,98 auf 73,04 (\approx 74,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), im Vergleich zur Kontrolle nach 7 Tagen eine ebenfalls hoch-signifikante Bglap-Zunahme von 4,04 auf 73,04 (\approx 18,1-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und bei Referenzierung zur Kontrolle des 10. Tages ein signifikanter Zuwachs der Bglap-Genexpression von 27,80 auf 73,04 (\approx 2,6-fache

Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachweisen. Für den Interfache-Bereich zeigte sich im singulären Stimulationsansatz mit 500 ng/ml rhBMP7 signifikant erhöhte Bglap-Genniveaus. Hierauf bezogen ergaben sich neben einer im Vergleich zur Kontrolle nach 3 Tagen hoch-signifikante Erhöhung von 0,97 auf 20,62 (\approx 21,3-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) eine in Bezug auf die Kontrolle des 7. Tages hoch-signifikante Bglap-Steigerung von 1,76 auf 20,62 (\approx 11,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Wurde die Kontrolle des 10. Tages zugrunde gelegt, fand sich eine sehr signifikante Zunahme des Bglap-Expressionslevels mit einer Wertsteigerung von 13,49 auf 20,62 (\approx 1,5-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Für die Genexpression von Bglap im Fibroblasten-Bereich nach singulärer rhBMP7-Zugabe ließen sich wie in den zuvor beschriebenen Bereichen ebenfalls positive und expressionsverstärkende Auswirkungen nachweisen. In besagtem Fibroblasten-Bereich kam es für die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag einerseits bezogen die Kontrolle des 3. Tages zu einer sehr signifikanten Bglap-Expressionszunahme von 1,00 auf 14,70 (\approx 14,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits im Vergleich zur Kontrolle nach 7 Tagen zu einer signifikanten Zunahme des Expressionsniveaus von 3,14 auf 14,70 (\approx 4,7-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Für die einmalige Stimulation mit 500 ng/ml resultierten im Fibroblasten-Bereich nach 10 Tagen signifikante Änderungen der Bglap-Expression. Präziser formuliert, ergaben sich hier einerseits bei Referenzierung zur Kontrolle am 3. Tag eine hoch-signifikante Bglap-Erhöhung von 1,00 auf 27,96 (\approx 28,0-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits unter Bezugnahme zur Kontrolle am 7. Tag eine hoch-signifikante Zunahme von 3,14 auf 27,96 (\approx 8,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Im Vergleich zur Kontrolle am 10. Tag ergab sich für die singuläre Stimulation mit 500 ng/ml eine hoch-signifikante Steigerung der Bglap-Expression von 14,70 auf 27,96 (\approx 1,9-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) im Fibroblasten-Bereich.

In der Betrachtung der repetitiven Stimulation mit rhBMP7 in der Dosis von 500 ng/ml zeigten sich im Osteoblasten-Bereich signifikante Veränderungen der Bglap-Expression sowohl in den unstimulierten Kontrollen als auch in dem Stimulationsansatz. Bei der unstimulierten Kontrolle am 10. Tag konnten signifikanten Erhöhungen der Bglap-Genniveaus nachgewiesen werden, wobei es neben einer hoch-signifikanten Steigerung von 1,06 auf 91,79 (\approx 86,6-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) bezogen auf die Kontrolle am 3. Tag zu einer hoch-signifikanten Bglap-Zunahme von 37,56 auf 91,79 (\approx 2,4-fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag)

beim Vergleich zur Kontrolle des 7. Tages kam. Darüber hinaus ließ sich am 7. Tag der multiplen Stimulation mit 500 ng/ml rhBMP7 im Bereich der Osteoblasten-Zone eine hoch-signifikante Erhöhung der Bglap-Genexpression nachweisen. Im Detail ergab sich hier einerseits in Bezug zur Kontrolle am 3. Tag eine hoch-signifikante Erhöhung des Bglap-Niveaus von 1,06 auf 181,29 ($\approx 171,0$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits in Relation zur Kontrolle nach 7 Tage eine hoch-signifikante Bglap-Zunahme von 37,56 auf 181,29 ($\approx 4,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag). Genauso wie am 7. Tag zeigten sich auch am 10. Tag der repetitiven Stimulation mit 500 ng/ml signifikante Genniveau-Steigerung von Bglap im Osteoblasten-Bereich. Es ergaben sich im Vergleich zur Kontrolle des 3. Tages eine hoch-signifikante Erhöhung der Bglap-Genexpression von 1,06 auf 373,97 ($\approx 352,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag), bei Referenzierung zur unstimulierten Kontrolle nach 7 Tagen eine hoch-signifikante Bglap-Expressionssteigerung von 37,56 auf 373,97 ($\approx 10,0$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und bezogen auf die Kontrolle nach 10 Tagen ein hoch-signifikanter Zuwachs der Bglap-Expression von 91,79 auf 373,97 ($\approx 4,1$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag). Für den Interface-Bereich kam es hinsichtlich der multiplen Applikation von rhBMP7 in der Dosierung von 500 ng/ml sowohl nach 7 Tagen der Stimulation als auch nach 10 Tagen der Versuchsdurchführungen zu statistisch signifikanten Bglap-Expressionsänderungen. Für den Zeitpunkt 7 Tage ließ sich eine signifikante Bglap-Steigerung von 0,92 auf 51,17 ($\approx 55,6$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) nachweisen. Am 10. Tag der Versuchsdauer zeigten sich je nach Bezugnahme zu den Kontrollzeitpunkten unterschiedlich stark gewichtete Signifikanzen im zuvor genannten Interface-Bereich. Einerseits ergab sich eine hoch-signifikante Bglap-Zunahme von 0,92 auf 14,32 ($\approx 15,6$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) im Vergleich zur Kontrolle des 3. Tages, andererseits ließen sich bei der Referenzierung auf die Kontrolle nach 7 Tagen oder nach 10 Tagen sehr signifikante Wertsteigerungen der Bglap-Expression nachweise. Bezogen auf die Kontrolle des 7. Tages konnte eine Wertsteigerung von 4,48 auf 14,32 ($\approx 3,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) und beim Vergleich zur Kontrolle am 10. Tag ein Wertzuwachs von 12,04 auf 14,32 ($\approx 1,2$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag) nachgewiesen werden. Parallel zur Genexpression-Steigerung von Bglap im Osteoblasten-Bereich und Interface-Bereich nach multipler rhBMP7-Applikation in einer Konzentration von 500 ng/ml resultierten auch im Fibroblasten-Bereich signifikante, expressionsfördernde Auswirkungen der besagten Stimulation. Hier zeigten sich einerseits in Bezug auf die Kontrolle des 3. Tages eine hoch-

signifikante Erhöhung der Bglap-Expression von 0,97 auf 91,93 ($\approx 94,8$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 3. Tag) und andererseits eine hoch-signifikante Expressionszunahme von 3,46 auf 91,93 ($\approx 26,6$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 7. Tag) bei Referenzierung auf die Kontrolle am 7. Tag. Darüber hinaus zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle nach 10 Tagen eine hoch-signifikante Steigerung des Bglap-Genniveaus mit einem Wertzuwachs von 7,98 auf 91,93 ($\approx 11,5$ -fache Erhöhung, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am 10. Tag).

3.6 Die histologischen Veränderungen nach rhBMP7-Stimulation

Die nachfolgenden beiden Abbildungen *Abbildung 33* und *Abbildung 34* zeigen die histologischen Veränderungen der singulären und multiplen rhBMP7-Stimulation nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 und 13 Tagen sowie die histologischen Befunde der Kontrollgruppe an den entsprechenden gleichen Zeitpunkten. Dabei stellt die *Abbildung 33* die histologischen Veränderungen im Original dar, während die mikroskopischen Bilder in der *Abbildung 34* mit Markierung der Interface-Flächen abgebildet sind, wobei diese mit Hilfe der im Abschnitt *2.5 Mikroskopie* beschriebenen Open Source-Software ImageJ bestimmt wurde.



Abbildung 33: Die histologischen Veränderungen nach rhBMP7-Stimulation ohne Markierung der Interface-Flächen (n = 2)

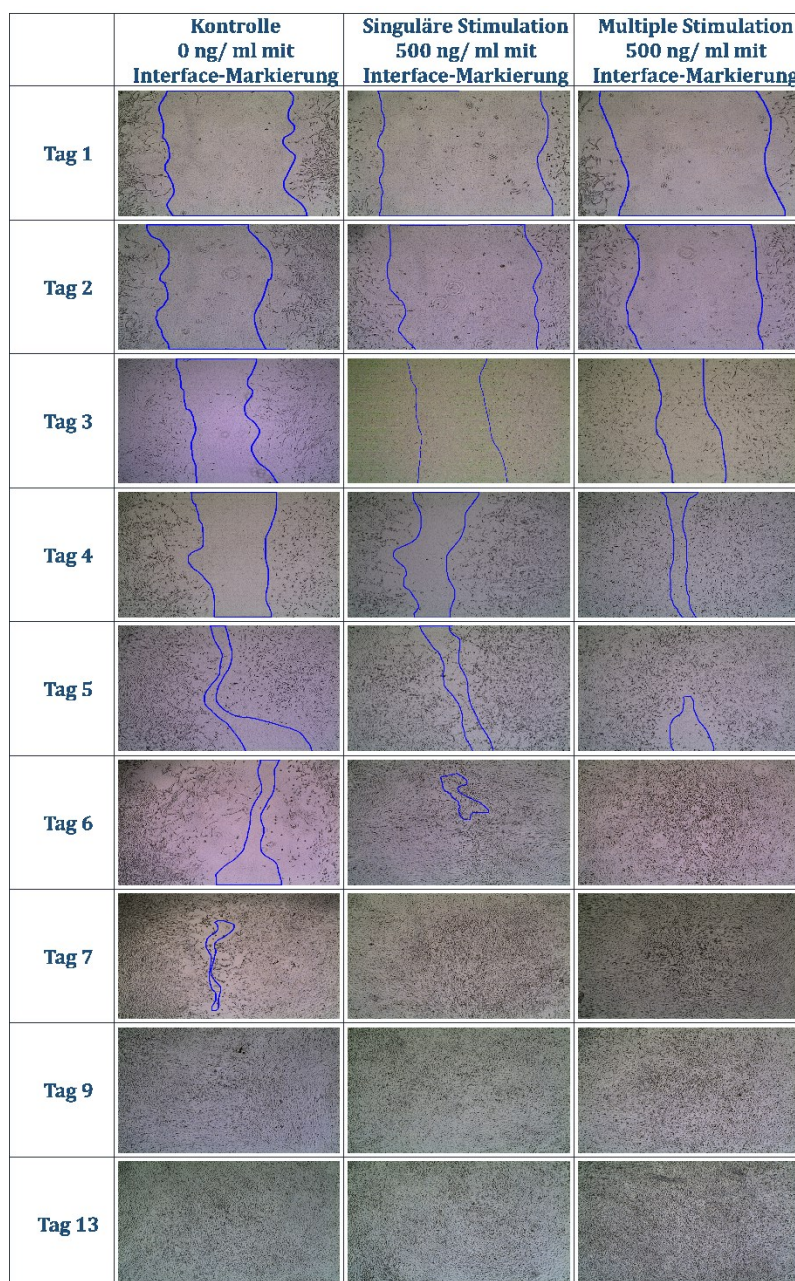


Abbildung 34: Die histologischen Veränderungen nach rhBMP7-Stimulation mit Markierung der Interface-Flächen (n = 2)

Wie im Abschnitt **2.5 Mikroskopie** beschrieben, wurden für die mikroskopischen Untersuchungen je zwei biologische Replikate pro Probe angelegt, so dass es sich um zwei unabhängige Experimente (n = 2) handelt.

Die nachfolgende **Tabelle 22** stellt die prozentualen Anteile der Interface-Fläche im Rahmen der mikroskopischen Versuchsdurchführungen dar, wobei diese Werte über die in der zuvor genannten Abbildung als Anteil der Pixel im Interface-Bereich berechnet wurden.

	Prozentuale Interface- Fläche für Kontrolle 0 ng/ml		Prozentuale Interface- Fläche für die singuläre Stimulation 500 ng/ml		Prozentuale Interface- Fläche für die multiple Stimulation 500 ng/ml	
	Absolut	Relativ zum Tag 1-Wert	Absolut	Relativ zum Tag 1-Wert	Absolut	Relativ zum Tag 1-Wert
Tag 1	56,2%	100,0%	73,7%	100,0%	69,4%	100,0%
Tag 2	44,9%	79,9%	62,6%	84,9%	56,2%	81,0%
Tag 3	30,4%	54,1%	33,6%	45,6%	23,6%	34,0%
Tag 4	29,9%	53,2%	20,8%	28,2%	7,0%	10,1%
Tag 5	11,0%	19,6%	9,3%	12,6%	5,3%	7,6%
Tag 6	10,8%	19,2%	3,0%	4,1%	0%	0%
Tag 7	2,3%	4,1%	0%	0%	0%	0%
Tag 9	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Tag 13	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Tabelle 22: Übersicht über die prozentuale Interface-Flächenanteile im Rahmen der Mikroskopie-Versuche

Die in der zuvor genannten Tabelle aufgelisteten prozentualen Wachstumsrate beziehungsweise Flächenanteile des Interface-Bereiches während der Versuchsdurchführung sind in den nachfolgenden beiden Abbildungen graphisch aufbereitet. Während die **Abbildung 35** den absoluten Verlauf der Interface-Flächenanteile – also das zunehmende Einwachsen der Zellen aus dem Osteoblasten-Bereich und dem Fibroblasten-Bereich in den Interface-Bereich – darstellt, zeigt die **Abbildung 36** die zeitliche Entwicklung der Interface-Flächen in den Kontroll- und Stimulationsansätzen relativ zum prozentualen Wert am 1. Tag des jeweiligen Versuches.

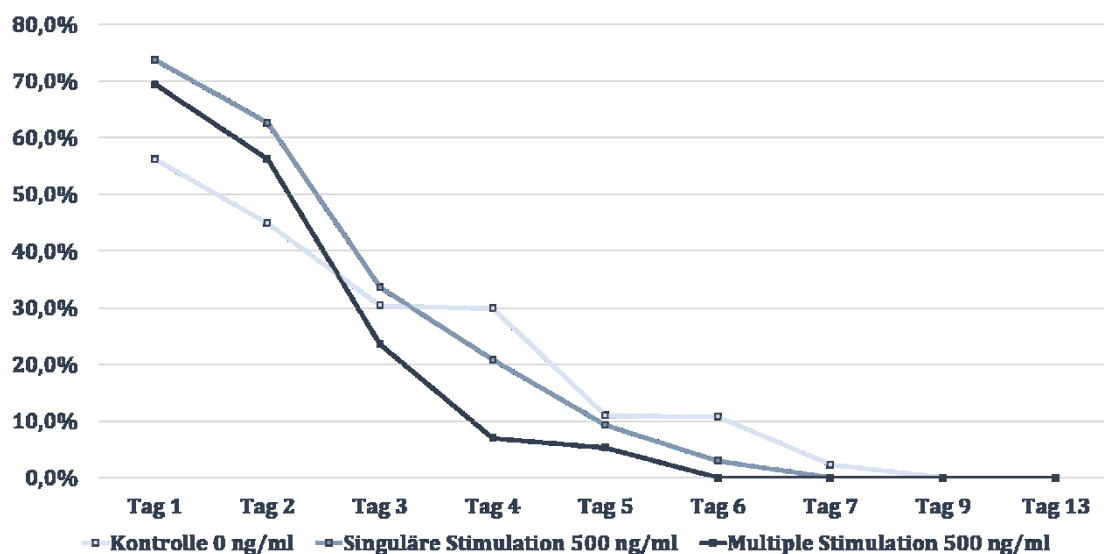


Abbildung 35: Absoluter Verlauf der Interface-Flächenanteile in den Kontroll- und Stimulationsansätzen

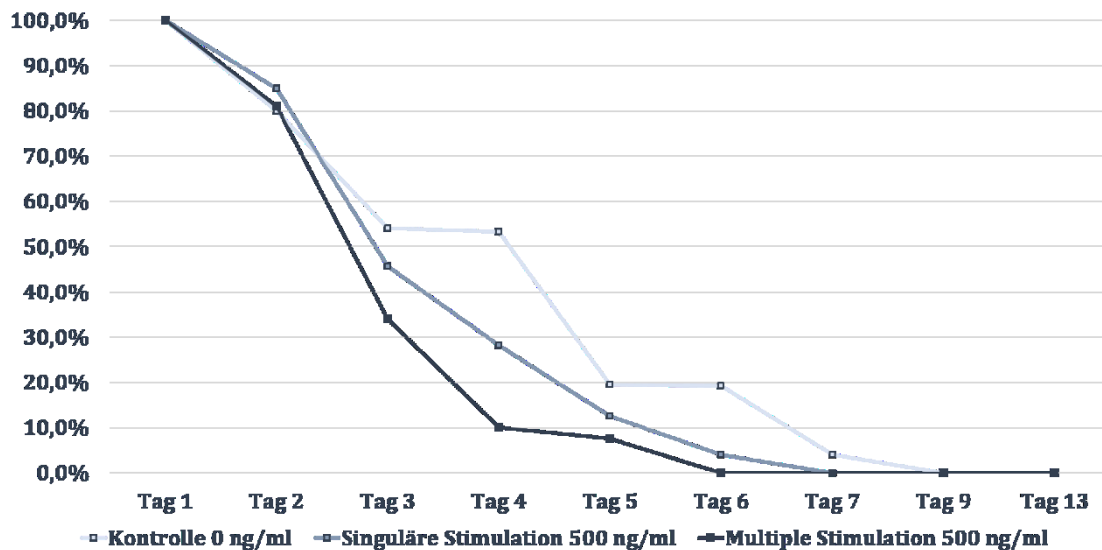


Abbildung 36: Verlauf der Interface-Flächenanteile in den Kontroll- und Stimulationsansätzen relativ zum Prozentwert am 1. Tag

Es zeigten sich wie in den zuvor genannten Tabellen beziehungsweise Grafiken dargestellt sukzessive Reduktionen der Interface-Flächen sowohl in den Kontrollexperimenten als auch in den Stimulationsversuchen. Dieser Trend ist gleichzusetzen mit einem progredienten Migrations- beziehungsweise Einwachsungsprozesses von Osteoblasten und Fibroblasten in den Schnittstellen-Bereich.

Für die Kontrolle zeigte sich für die Tage 1 bis 7 eine schrittweise Verringerung der prozentualen Interface-Fläche von 56,2% (1. Tag) auf 44,9% (2. Tag) auf 30,4% (3. Tag) auf 29,9% (4. Tag) auf 11,0% (5. Tag) auf 10,8% (6. Tag) bis schließlich auf 2,3% (7. Tag). Ab dem Zeitpunkt 9 Tage stellte sich der Interface-Bereich vollständig mit Zellen gefüllt dar. Relativ zum Prozentwert am 1. Tag ergaben die Kontrollversuchsdurchführungen eine Reduktion des initial leeren Interface-Bereichsanteils beginnend von 100% (1. Tag) auf 79,9% (2. Tag) auf 54,1% (3. Tag) auf 53,2% (4. Tag) auf 19,6% (5. Tag) auf 19,2% (6. Tag) auf 4,1% (7. Tag).

In der Betrachtung der singulären Stimulation mit 500 ng/ml zeigte sich die Interface-Fläche sukzessive erniedrigt mit einer im Vergleich zur Kontrolle schnelleren Abnahme beziehungsweise mit einer in Relation zur multiplen Stimulation mit 500 ng/ml verzögerten Reduktion. Diesbezüglich zeigte sich absolut eine Abnahme der prozentualen Interface-Fläche vom 1. Tag bis zum 6. Tag von 73,7% (1. Tag) auf 62,6% (2. Tag) auf 33,6% (3. Tag) auf 20,8% (4. Tag) auf 9,3% (5. Tag) bis schließlich auf 3,0% (6. Tag). In der singulären Stimulation zeigte sich bereits am 7. Tag ein vollständig mit Osteoblasten- und Fibroblasten gefüllter Interface-Bereich, wohingegen diese Komplettierung der Interface-Region in der

Kontrolluntersuchung erst am 9. Tag erreicht wurde. In Relation zum prozentualen Wert am 1. Tag gesehen, ließen sich die Werte des Interface-Bereiches im singulären Stimulationsansatz für die Tage 1-6 auch mit der Reduktionsreihenfolge von 100,0% (1. Tag) auf 84,9% (2. Tag) auf 45,6% (3. Tag) auf 28,2% (4. Tag) auf 12,6% (5. Tag) auf 4,1% (6. Tag) beschreiben.

In der semi-quantitativen Mikroskopie-Untersuchung der multiplen Stimulation mit 500 ng/ml ergab sich sowohl im Vergleich zur Kontrolldurchführung als auch zur singulären Stimulation eine beschleunigte, vorzeitige Migration von Osteoblasten und Fibroblasten in den Interface-Bereich. Hier zeigte sich bereits am 6. Tag der Versuchsdurchführungen eine vollständige Füllung der Interface-Region, wohingegen diese Komplettierung des Schnittstellen-Bereichs in der singulären Stimulation erst am 7. Tag und in der Kontrolle gar erst am 9. Tag zustande kam. In der absoluten Betrachtung des 1. Tag bis zum 5. Tag ergab sich eine prozentuale Interface-Flächenreduktion von 69,4% (1. Tag) auf 56,2% (2. Tag) auf 23,6% (3. Tag) auf 7,0% (4. Tag) bis schließlich auf 5,3% (5. Tag). In Bezug auf den Prozentwert am 1. Tag ließen sich die zuvor genannten Werte auf die sukzessive Reduktionsreihe von 100,0% (1. Tag) auf 81,0% (2. Tag) auf 34,0% (3. Tag) auf 10,1% (4. Tag) auf 7,6% (5. Tag) konvertieren.

Insgesamt resultierte in der semi-quantitativen Auswertung der histologischen Veränderungs-Analyse mittels Lichtmikroskopie eine durch rhBMP7 akzelerierte Migration von Osteoblasten und Fibroblasten in den Interface-Bereich, welche sich im Vergleich zur Kontrollversuchsdurchführung für die singuläre rhBMP7-Applikation bereits 2 Tage zuvor vollständig geschlossen und bezüglich der multiplen Stimulation mit rhBMP7 sogar 3 Tage zuvor gänzlich ausgefüllt zeigte.

4. Diskussion

In diesem Kapitel werden die im vorherigen Abschnitt dargestellten Ergebnisse der quantitativen real-time PCRs und der histologischen Untersuchungen nach rhBMP7-Stimulation diskutiert und interpretiert. Initial erfolgt eine chronologische Analyse der einzelnen untersuchten Gene für die Differenzierungs-Marker und für die extrazelluläre Matrix, woraufhin sich eine Interpretation der Ergebnisse der histologischen Versuche anschließt. Zuletzt werden die molekularbiologischen Veränderungen nach Applikation von rhBMP7 in Gesamtschau dargestellt und die in dieser Arbeit etablierte Methode der Co-Kultivierung muriner Osteoblasten und Fibroblasten inklusive der etwaiger Vorteile und Nachteile diskutiert.

4.1 Die Runx2-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Wie in der Fachliteratur durch Komori (2010) beschrieben, dient der runt-ähnliche Transkriptionsfaktor 2 (englisch: runt-related transcription factor 2), kurz Runx2 genannt, als Initiator der osteogenen Differenzierung und ist als erster Transkriptionsfaktor für die Festlegung der osteoblastischen Zelllinien-Entwicklung notwendig. Runx2 induziert die Differenzierung pluripotenter mesenchymaler Zellen zu unreifen Osteoblasten und triggert die Expression extrazellulärer Matrix-Proteine und die Bildung von unreifer Knochenmatrix. Dabei konnte Komori (2010) eine Runx2-Genexpression erstmalig in mesenchymalen Zellen beziehungsweise in Prä-Osteoblasten nachweisen. Weiterhin konnte im unreifen Osteoblasten eine sukzessive Hochregulierung der besagten Runx2-Expression festgestellt werden, wobei es anschließend und mit zunehmendem Übergang zum reifen Osteoblasten zu einer erneuten Herabregulation des Genexpressionslevel kam. Eine persistierende Expression von Runx2 führt jedoch wie in Komori (2010) beschrieben zu einer Verhinderung der letzten Schritte der Osteoblasten-Reifung beziehungsweise zum Ausbleiben der Ausreifung der Knochenmatrix, weshalb eine konstante Runx2-Expression eine Art Stagnation der Osteoblasten im noch unreifen Entwicklungszustand bewirkt. Da eine persistente Runx2-Expression im reifen Osteoblasten nicht nachweisbar ist, erfolgt bei reifen osteoblastischen Zellen die Induktion beziehungsweise Aufrechterhaltung der Genexpression von Knochenmatrix-Proteine notwendigerweise über andere Signaltransduktionswege beziehungsweise über andere Signalmoleküle (Komori, 2010).

In dem Kapitel **3.1 Die Runx2-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation** werden detailliert die Veränderungen der Runx2-Genexpression nach singulärer und nach multipler rhBMP7-Stimulation beschrieben.

Hier zeigten sich im Osteoblasten-Bereich nur marginale Veränderungen der Genexpression von Runx2. Es ließ sich zwar eine statistisch signifikante, jedoch nur geringgradige Hochregulierung im Rahmen der singulären rhBMP7-Stimulation und nur für die Dosis von 100 ng/ml nachweisen. Diesbezüglich zeigte sich einerseits eine 2,5-fache Expressionserhöhung nach 7 Tagen und andererseits eine 3,4-fache Steigerung der Runx2-Genexpression nach 10 Tagen. Bei den durchgeführten Versuchen mit multipler rhBMP7-Stimulation ließen sich keine signifikanten Effekte auf die Runx2-Genexpression in den Osteoblasten ableiten.

In Bezug auf die Zellen im Fibroblasten-Bereich zeigten sich positive Effekte der rhBMP7-Stimulation. Im Rahmen der singulären Stimulation kam es zu einer dosisabhängigen Runx2-Expressionserhöhung. Bereits am 3. Tag der singulären Stimulations-Versuchsreihe ergab sich ein Anstieg der Runx2-Expression, jedoch war diese Erhöhung noch nicht im statistisch signifikanten Bereich. Solche signifikanten Ergebnisse waren dann am 7. Tag und für die Konzentration von 500 ng/ml rhBMP7 nachweisbar, an welchem es zu einer Genexpressionserhöhung von Runx2 auf den 5,0-fachen Wert kam. Auch am 10. Tag der singulären Stimulationsexperimente lagen statistisch signifikante Resultate vor, so dass sich für die Konzentration von 100 ng/ml eine 5,5-fache Wertsteigerung und für die Dosis von 250 ng/ml ein 2,4-fache Runx2-Expressionsanstieg nachweisen ließ. Tendenziell zeigte sich am 10. Tag der singulären rhBMP7-Applikation für die höchste Konzentration von 500 ng/ml rhBMP7 schon ein Absinken des Runx2-Genexpressionsniveaus, jedoch fiel dieser Runx2-Abfall nicht statistisch signifikant aus. Die beobachteten Auswirkungen ließen sich ebenfalls und in einer dosisabhängigen Form in der multiplen Stimulations-Versuchsreihe nachweisen. Auch hier resultierten Runx2-Genexpressionserhöhungen, wobei die Expressionslevel aufgrund der mehrfachen rhBMP7-Gabe entsprechend höhere Werte aufwiesen. So ließ sich im Vergleich zu den Expressionsniveaus nach einmaliger rhBMP7-Gabe eine nahezu perfekt skalierte Verdopplung am 7. Tag nach zweifacher rhBMP7-Applikation nachweisen. Die in den singulären Versuchen tendenziell beobachtete Verminderung der Genexpression nach 10 Tagen bestätigte sich in den multiplen Versuchen ebenfalls und fiel in diesen auch statistisch signifikant aus. So ergab sich am 10. Tag sowohl für die rhBMP7-Konzentration von 100 ng/ml als auch für die rhBM7-Dosis von 250 ng/ml ein Abfall der Runx2-Genexpression um den 3,1-fachen Wert. Darüber hinaus konnte für die Höchstdosierung von 500 ng/ml rhBMP7 mit einer 7,2-fachen Erniedrigung ein noch höherer Rückgang des Runx2-Expressionsniveaus beobachtet werden.

In der Interface-Zone ließen sich zum Fibroblasten-Bereich ähnliche Ergebnisse aus den vorliegenden experimentellen Daten herleiten. Während bei der singulären rhBMP7-Stimulation lediglich dezente, aber nicht statistisch signifikante Runx2-Expressionsanstiege mit 2,5-facher, 2,9-facher beziehungsweise 2,2-facher Erhöhung für eine rhBMP7-Konzentration von 100 ng/ml und für die Zeitpunkte 3 Tage, 7 Tage und 10 Tage nachweisbar waren, ergab sich am 10. Tag der Versuchsdurchführung eine statistisch signifikante, 15,6-fache Verminderung der Runx2-Expression für die Konzentration von 500 ng/ml. Bei mehrfacher Applikation resultierten nach 7 Tagen beziehungsweise nach 10 Tagen signifikante Erniedrigungen im Runx2-Expressionsniveau. Während es am 7. Tag zu einem Abfall um den 3,7-fachen Wert für die Konzentration von 100 ng/ml, um den 2,6-fachen Wert für die Konzentration von 250 ng/ml und um den 3,2-fachen Wert für die Konzentration von 500 ng/ml kam, konnte am 10. Tag der Versuchsdurchführung für die rhBMP7-Dosis von 250 ng/ml eine signifikante Runx2-Reduktion um den 51,5-fachen Wert nachgewiesen werden. Die beobachteten Genexpressionsniveaus im Interface-Bereich lagen vergleichsweise niedriger als die Werte des Fibroblasten-Bereich. Dieser Befund lässt sich einerseits dadurch erklären, dass die beteiligten Zelllinien initial in den Interface-Bereich migrieren und dort proliferieren müssen, weswegen diese Zellen noch keine Differenzierung durchlaufen beziehungsweise durchführen, und sich andererseits damit begründen, dass die Zellpopulation im Interface-Bereich sowohl aus migrierten Osteoblasten und Fibroblasten gebildet wird.

In Gesamtschau der Runx2-Ergebnisse ergeben sich nur geringe und nicht-dosisabhängige Auswirkungen von rhBMP7 auf die Runx2-Genexpression in Osteoblasten. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass eine rhBMP7-Stimulation nur kurzfristige Effekte auf die Runx2-Niveaus in Osteoblasten zeigt, wonach es aufgrund von intrazellulären Feedback-Regulationen und Rückkopplungsmechanismen des Runx2-Transkriptionsfaktors zu einer schnellen Normalisierung des bereits vorhandenen Expressionsniveaus kommt. Analog zu den in dieser Arbeit erhobenen experimentiellen Runx2-Expressionsdaten konnten unterschiedliche Autoren (Carbonare *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2010; Jonason *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2000) konstante Runx2-Niveaus im Rahmen der Entwicklung von Progenitor-Zellen zu Prä-Osteoblasten nachweisen, wobei die Runx2-Regulation in Osteoblasten nach Hassan *et al.* (2010), Lee *et al.* (2000) und Jonason *et al.* (2009) nicht über die Expressionsstärke beziehungsweise über die Anzahl der RNA-Moleküle, sondern über andersweitige Mechanismen auf Gen-Ebene (über DNA-Methylierung) oder auf Protein-Ebene (Aktivierung und Inaktivierung über Phosphorylierung und Dephosphorylierung) realisiert wird.

Im Kontrast zu den Resultaten bezüglich der Osteoblasten zeigen sich durch die rhBMP7-Applikation deutliche Effekte auf die Runx2-Expression in den untersuchten Fibroblasten, die damit Hinweise auf eine osteoblastische Transdifferenzierung der fibroblastischen Zellen liefern. Während in normalen fibroblastischen Zellen Runx2 nicht nachweisbar ist, führt eine gezielte rhBMP7-Applikation initial zu einer Induktion der Runx2-Genexpression. Dabei ist dieser positive, expressionssteigernde Effekt dosisabhängig und findet anhand der vorliegenden experimentellen Daten in den ersten Tagen statt. Die vorliegenden experimentellen Werte lassen zusätzlich vermuten, dass nach Erreichen eines spezifischen Runx2-Niveaus oder nach Erlangen eines bestimmten, durch Runx2-vermittelten Entwicklungs-Stadiums – in welchem es zur Ausbildung osteogener Eigenschaften in den fibroblastischen Zellen kommt – eine Normalisierung oder Stabilisierung beziehungsweise sogar eine Herab-Regulation der Runx2-Expression stattfindet. So lässt sich vermuten, dass sich eine kontinuierliche beziehungsweise konstante Runx2-Expression hinderlich für die Weiterentwicklung der Zellen zu reifen Osteoblasten auswirkt und die nächsten Schritte der osteogenen (Trans-)Differenzierung nicht über Runx2 vermittelt werden. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von Komori (2010), welche dem Transkriptionsfaktor Runx2 die Initiierung der osteogenen Differenzierung zuschreibt. Dabei werden die darauffolgenden Prozesse der osteogenen Zellentwicklung von anderen Faktoren und Mediatoren hervorgerufen, wohingegen die Aufrechterhaltung der Runx2-Genexpression gar zu einer Stagnation der Zellen im Stadium der unreifen Osteoblasten führt. Auch die Ergebnisse von Hassan *et al.* (2010), Lee *et al.* (2000) und Jonason *et al.* (2009) beschreiben die Funktion von Runx2 als Transkriptionsfaktor, welchem in der Differenzierung von Progenitor-Zellen zu Prä-Osteoblasten eine positive, induktive Rolle zukommt. Darüber hinaus ist die Möglichkeit der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu funktionsfähigen Osteoblasten bereits mehrfach in der Literatur (Cho *et al.*, 2017; Yamamoto *et al.*, 2015) vermutete worden beziehungsweise beschrieben worden, wobei die in dieser Arbeit erhobenen experimentellen Daten besagte These stützen.

4.2 Die Col1a1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Kollagen Typ I stellt einen wichtigen Bestandteil der Knochenmatrix dar und macht daher einen bedeutenden Anteil der extrazellulären Protein-Fraktion aus. Dabei setzt es sich das Kollagen Typ I-Protein aus zwei posttranskriptionell prozessierten Alpha-Ketten und einer Beta-Kette zusammen, wobei die Alpha-Ketten durch das Col1a1-Gen codiert werden. Daher kann das Col1a1-Gen repräsentativ für die Kollagen Typ I-Synthese herangezogen werden. Im Rahmen der osteogenen Differenzierung kommt es nach initialer, Runx2-vermittelter Entwicklung der mesenchymalen Vorgängerzellen zu Osteoprogenitor-Zellen zu einer Änderung der Col1a1-Genexpression. So lässt sich im Rahmen des Überganges in das Stadium des Prä-Osteoblasten eine Erhöhung der Col1a1-Expression nachweisen, die der Bildung der notwendigen Knochenmatrix diene (Cohen, 2006). Nach der Reifung der Knochenmatrix und auf dem weiteren Weg der osteogenen Entwicklung zum reifen Osteozyten erfolgt nach Khurana (2016) die Reduktion beziehungsweise Herabregulierung der Col1a1-Genexpression. Somit stellt Col1a1 einen Marker der frühen osteogenen Differenzierung dar, wobei die Genexpressionslevel mit dem weiteren Fortschreiten in der Osteoblasten-Entwicklung eine sukzessive Reduktion erfahren.

Wie im Kapitel **3.2 Die Col1a1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation** ausführlich beschrieben, zeigten sich für die unstimulierten Kontrollen sowohl im Osteoblasten-Bereich als auch im Fibroblasten-Bereich und im Interface-Bereich mit dem zeitlichen Versuchsverlauf ansteigende Col1a1-Expressionsniveaus. Lediglich im Osteoblasten-Bereich ergab sich am 10. Tag der Experimente eine tendenzielle Reduktion des Col1a1-Genexpressionsniveaus. Es resultierten statistisch signifikante Anstiege der Col1a1-Expressionsniveaus, die am 7. Tag der experimentellen Durchführung zwischen dem 1,5-fachen Wert (für die multiple rhBMP7-Stimulation im Osteoblasten-Bereich) und dem 7,3-fachen Wert (für die singuläre rhBMP7-Stimulation im Osteoblasten-Bereich) und am 10. Tag der Versuchsansätze zwischen dem 3,1-fachen (für die multiple rhBMP7-Stimulation im Fibroblasten-Bereich) und dem 4,3-fachen Wert (für die singuläre rhBMP7-Stimulation im Fibroblasten-Bereich) lagen. Einzig für den Osteoblasten-Bereich zeigte sich keine Tendenz zum weiteren Anstieg der Col1a1-Genexpressionslevel, so dass sich diesbezüglich eine Reduktion des Expressionsniveaus vom 7,3-fachen Wert auf einen 3,2-fachen Wert für die singuläre rhBMP7-Stimulation beziehungsweise vom 1,5-fachen Wert auf einen 1,1-fachen Wert für die multiple rhBMP7-Stimulation beobachten ließ.

Für den Osteoblasten-Bereich zeigte die singuläre Stimulation einen positiven Effekt auf die Col1a1-Stimulation, hier kam es für die Konzentrationen von 100 ng/ml, von 250 ng/ml

und von 500 ng/ml rhBMP7 und im Vergleich zu den Werten der unstimulierten Kontrolle am 10. Tag zu einer 2,7-fachen, 1,9-fachen beziehungsweise 3,5-fachen Erhöhung der Col1a1-Genexpression. Die Auswirkungen der multiplen rhBMP7-Stimulation lieferten widersprüchliche Ergebnisse im Vergleich zu den Resultaten der singulären Applikation von rhBMP7. So ergaben sich für die multiplen Stimulationen mit rhBMP7 zahlreiche signifikante Reduktionen der Col1a1-Genlevel, wobei die Werte in einem Intervall zwischen einer 1,4-fachen Erniedrigung (für eine rhBMP7-Konzentration von 500 ng/ml am 10. Tag) und einer 2,9-fachen Erniedrigung (für eine rhBMP7-Konzentration vom 500 mg/ml am 3. Tag) lagen.

Die Ergebnisse im Fibroblasten-Bereich und Interface-Bereich ähneln den zuvor genannten Beobachtungen im Osteoblasten-Bereich. So konnten bei der singulären Stimulation mit rhBMP7 im Fibroblasten-Bereich und Interface-Bereich Erhöhungen der Col1a1-Genexpressionsniveaus nach 7 Tagen beziehungsweise nach 10 Tagen nachgewiesen werden, wobei sich im Vergleich zu den Werten im Osteoblasten-Bereich niedrigere Anstiege der Col1a1-Genlevel bis einer maximalen Steigerung um den 1,8-fachen Wert im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen ergaben. Für die multiplen rhBMP7-Stimulationen zeigten sich im Fibroblasten- und Osteoblasten-Bereich ebenfalls wie im Osteoblasten-Bereich reduktive Effekte auf die Col1a1-Genexpression, wobei auch diese Verminderungen der Col1a1-Expressionsniveaus bezogen auf die Werte im Osteoblasten-Bereich weniger ausgeprägt waren.

Unter Berücksichtigung aller experimentellen Daten zeigten die unstimulierten Proben, die dem natürlichen Verlauf der Experimente ohne den Einfluss von rhBMP7 widerspiegeln, in allen drei experimentell unterschiedenen Bereichen Hochregulationen der Col1a1-Genexpression, was für eine Runx2-vermittelte Entwicklung vom Prä-Osteoblasten-Stadium zum Osteoblasten-Stadium sprach. Für den Osteoblasten-Bereich ließ sich auch die Reduktion der Col1a1-Genexpression am 10. Tag in den vorliegenden Experimenten nachweisen, wobei sich diese Veränderung mit der von Khurana (2016) postulierten, natürlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung zum reifen Osteozyten deckt. Diese Herabregulierung der Col1a1-Genexpression konnte für den Fibroblasten-Bereich beziehungsweise für den Interface-Bereich nicht beobachtet werden. Dieser Befund hängt vermutlich damit zusammenhängt, dass die Fibroblasten im Fibroblasten-Bereich ohne rhBMP7-Stimulation keine beziehungsweise nur im geringen, nicht nachweisbaren Grad eine Transdifferenzierung mit Ausbildung osteogener Eigenschaften durchlaufen und dass im Interface-Bereich die Proliferation der Zellen zum Ausfüllen der zellfreien Areale gegenüber der Zell-Differenzierung bevorzugt wird.

Im Rahmen der rhBMP7-Stimulation ließen sich für die singuläre, also einmalige rhBMP7-Stimulation expressionssteigernde Effekte auf die Col1a1-Genexpression nachweisen, wohingegen sich bei der mehrfachen rhBMP7-Stimulation eine negative, also reduktive Wirkung auf die Col1a1-Genexpressionsniveaus zeigte. Wie bereits im vorhergehenden Kapitel zur Untersuchung der rhBMP7-Gabe auf die Runx2-Genexpression postuliert, könnte eine mehrfache und damit kontinuierliche Applikation von rhBMP7 ein Hindernis der osteogenen Differenzierung vom Prä-Osteoblasten zum Osteoblasten darstellen und die Zellen in einem prä-osteoblastischen Zustand fixieren. Diese auch in Komori (2010) und Hassan *et al.* (2010) beschriebene Stagnation führt letztendlich dazu, dass die Einleitung der nächsten Schritte der Osteoblasten-Differentierung inhibiert oder blockiert werden, weshalb sich keine Änderungen von Markergenen nachweisen lassen. Dadurch resultiert die in den vorliegenden Versuchen nachgewiesene relative Col1a1-Expressionsabnahme, da sich die Col1a1-Expressionslevel in den multiplen rhBMP7-Ansätzen im Vergleich zu den steigenden Expressionsniveaus in den unstimulierten Kontrollen konstant zeigten.

4.3 Die Alp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Wie im Abschnitt **1.6.3 Studien-Aufbau und konzeptionelle Versuchsplanung** beschrieben, kann die knochenspezifische alkalische Phosphatase (Alp1) und ihr Genexpressions-Muster als Marker für die osteogene Differenzierung beziehungsweise für den Knochenaufbau herangezogen werden. Dabei wird Alp1 als etabliertes Markergen angesehen (Tuckermann *et al.*, 2000), welches in Arbeiten von Cohen (2006) ab dem Prä-Osteoblasten-Stadium nachweisbar ist und parallel zum sukzessiven Fortschreiten der osteogenen Differenzierung ansteigt. Nach Khurana (2016) und Weinreb *et al.* (1990) zeigen sich für Alp1, Spp1 und Bglap asynchrone Expressionsmuster, bei welchen die Hochregulierung der Alp1-Expression zeitlich vor der Expressionssteigerung von Spp1 und Bglap stattfindet. Damit kann gemäß Khurana (2016) und Weinreb *et al.* (1990) Alp1 als Marker der frühen bis mittleren osteogenen Differenzierung betrachtet werden.

Die Ergebnisse der Alp1-Expressionsveränderungen aus den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchsdurchführungen sind im Kapitel **3.3 Die Alp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation** ausführlich beschrieben.

Für die Alp1-Entwicklung im Osteoblasten-Bereich zeigten sich sowohl in der singulärer rhBMP7-Stimulation als auch in der multiplen rhBMP7-Applikation positive, expressionsverstärkende Effekte. In den unstimulierten Kontrollen ergab sich auch ohne den Einfluss der rhBMP7-Substitution ein signifikanter Anstieg der Alp1-Expression bis zum 7. Tag, wonach sich ein leichter Abfall des Genexpressionslevel bis zum Tag 10 der experimentellen Durchführung anschloss. So ergaben sich für die singuläre Stimulation 40,2-fach erhöhte beziehungsweise für die multiple rhBMP7-Gabe 3,7-fach erhöhte Alp1-Genexpressionslevel am 7. Tag der Versuche. Anschließend kam es am 10. Tag der Experimente für die singuläre rhBMP7-Applikation zu einer 1,8-fachen Verminderung und für die mehrfache rhBMP7-Stimulation zu einer 1,4-fachen Reduktion, wobei hier das Alp1-Genniveau des 7. Tages zum Vergleich zugrunde gelegt wurde.

Im Rahmen der singulären Stimulation und der multiplen rhBMP7-Gabe ließen sich die bei den unstimulierten Kontrollen beobachteten Abfälle der Alp1-Expression nicht nachweisen, insbesondere zeigten sich hier die gegenteiligen Befunde von Erhöhungen der Alp1-Genexpression. Für die singuläre Stimulation mit rhBMP7 im Osteoblasten-Bereich kam es im Vergleich zu den Kontrollwerten und für die Konzentration von 100 ng/ml zu einem 3,0-fachen Alp1-Expressionsanstieg beziehungsweise für die Konzentration von 500 ng/ml rhBMP7 zu einer 2,7-fachen Alp1-Expressionssteigerung am 10. Tag. Noch weitere, signifikante Auswirkungen auf die Alp1-Expression konnten im Rahmen der mehrfachen

rhBMP7-Stimulation nachgewiesen werden. Hier ergaben sich für die Konzentrationen von 100 ng/ml, von 250 ng/ml und von 500 ng/ml rhBMP7 am 10. Tag der Versuchsdurchführungen Steigerungen der Alp1-Genexpression auf den 1,4-fachen Wert, auf den 3,5-fachen Wert beziehungsweise gar auf den 10,5-fachen Wert bezogen auf die jeweilige unstimulierte Kontroll-Probe.

Sowohl für den Fibroblasten-Bereich als auch für den Interface-Bereich zeigten sich in den unstimulierten Kontrollen durchweg natürliche Genexpressionssteigerungen von Alp1 im zeitlichen Verlauf. So ergaben sich beispielsweise für die singuläre rhBMP7-Stimulation im Fibroblasten-Bereich Steigerungen der Alp1-Expression auf eine 4,3-fachen Wert nach 7 Tagen beziehungsweise auf einen 7,3-fachen Wert nach 10 Tagen. Ebenfalls für die singuläre rhBMP7-Versuche resultierten im Interface-Bereich nach 10 Tagen experimenteller Durchführung Alp1-Expressionssteigerungen um das 20,4-fache. Der für die Kontrollen im Osteoblasten-Bereich nachgewiesene, leichtgradige Abfall der Genexpression von Alp1 am 10. Tag der Versuchsdurchführungen konnte im Fibroblasten- und Interface-Bereich nicht nachgewiesen werden. Für die singuläre rhBMP7-Gabe und für die multiple rhBMP7-Stimulation zeigten sich tendenziell für alle Konzentrations-Varianten expressionsverstärkende Effekte bezüglich Alp1. Im Fibroblasten-Bereich ergaben sich im singulären Ansatz und für die Konzentration von 100 ng/ml beziehungsweise für die Dosierung mit 250 ng/ml rhBMP7 eine 45,4-fache Steigerung respektive eine 13,0-fache Erhöhung der Alp1-Genexpression, wobei die unstimulierten Kontrollen an den gleichen Zeitpunkten zum Vergleich herangezogen wurden. Darüber hinaus konnte in der multiplen rhBMP7-Stimulation für die Dosis von 250 ng/ml rhBMP7 eine 4,9-fache Alp1-Expressionssteigerung in Relation zur unstimulierten Kontrolle nachgewiesen werden. Im Interface-Bereich ergaben sich nach einfacher rhBMP7-Zugabe am 7. Tag für die Konzentrationen von 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml Alp1-Steigerungen auf den 2,6-fachen Wert, auf den 2,2-fachen Wert beziehungsweise auf den 2,3-fachen Wert. Desweiteren konnte ebenfalls am 7. Tag der experimentellen Durchführung für die multiple rhBMP7-Applikation und im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollwerten an den gleichen Zeitpunkten mehrere Alp1-Erhöhen beobachtet werden. Diesbezüglich ergaben sich für die Konzentrationen von 250 ng/ml rhBMP7 und von 500 ng/ml rhBMP7 Anstiege der Alp1-Genexpression auf den 3,0-fachen Wert beziehungsweise auf den 3,4-fachen Wert.

In Anbetracht der Alp1-Genexpressions-Daten ergab sich in den untersuchten unstimulierten Kontrollen eine natürliche, stimulationsunabhängige Zunahme der Alp1-Expressionsdaten bis zum 7. Versuchstag, wonach sich ein dezenter Rückgang des

Genexpressionsniveaus anschloss. Die vorliegenden Daten lassen darauf schließen, dass sich sowohl die singulären als auch repetitiven rhBMP7-Stimulationen positiv auf die Alp1-Expressionen einerseits in den untersuchten Osteoblasten und andererseits in den analysierten Fibroblasten auswirkten. Die beschriebenen Alp1-Expressionssteigerungen zeigten sich dabei sowohl dosisabhängig als auch abhängig von der Anzahl der rhBMP7-Stimulationen. Die beobachtete Induktion der Alp1-Genexpression deckt sich mit den von Kim *et al.* (2018) und Aoki *et al.* (2001) postulierten Resultaten, die diesen Effekt auch für weitere Mitglieder der BMP-Familie beschrieben. Weiterhin unterstützt der Nachweis einer Alp1-Genexpression im Fibroblasten-Bereich und im Interface-Bereich auch die These, dass es zur Ausbildung osteogener Eigenschaften in den verwendeten fibroblastischen Zellen kommt. Diese Transformation von Fibroblasten zu funktionsfähigen Osteoblasten ist in der aktuellen Literatur sowohl von Cho *et al.* (2017) als auch von Yamamoto *et al.* (2015) beschrieben. Dabei wurde von Cho *et al.* (2017) eine direkte Transdifferenzierung mittels epigenetischer Modifikationen und unter Einsatz von BMP2 bewerkstelligt, wohingegen Yamamoto *et al.* (2015) diese zelluläre Reprogrammierung über die Aktivierung und Transduktion mehrerer spezifischer Transkriptionsfaktoren auslöste. In diesem Zusammenhang erscheint auch die hier beobachtete, BMP7-vermittelte Transdifferenzierung von Fibroblasten zu funktionsfähigen Osteoblasten nachgewiesenermaßen möglich und realitätsnah.

4.4 Die Spp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Das Spp1-Gen codiert für das Protein Osteopontin, welches als extrazellulärer Strukturprotein ein Teil der reifen Knochenmatrix darstellt (Cohen, 2006). Ab dem Stadium der Osteoprogenitorzelle lassen sich im Rahmen der osteogenen Differenzierung neben der gesteigerten Expression von Bglap auch zunehmende Expressionslevel für Spp1 nachweisen (Khurana, 2016; Luu *et al.*, 2006). Nach Weinreb *et al.* (1990) und Khurana (2016) erfolgt im Anschluss an die Alp1-Expressionserhöhung die Hochregulierung von Spp1, woraufhin wiederum eine Bglap-Expressionszunahme erfolgt. Dabei sehen die zuvor genannten Autoren Spp1 als Marker der mittleren bis späten osteogenen Entwicklung, der sich als Differenzierungsmarker im chronologischen Ablauf der Osteogenese zwischen Alp1 und Bglap einsortiert.

Wie im Kapitel **3.4 Die Spp1-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation** ausführlich beschrieben, zeigten sich im Osteoblasten-Bereich für die unstimulierten Kontrollen zeitabhängige, dem chronologischen Ablauf angepasste Steigerungen der Spp1-Expressionslevel. Hier ergab sich im Vergleich zum Expressionsniveau am 3. Tag einerseits für die multiple Stimulation mit rhBMP7 an 7. Tag eine signifikante Erhöhung auf den 2,1-fachen Wert und andererseits für die singuläre rhBMP7-Applikation am 10. Tag eine 2,9-fache Spp1-Genexpressionszunahme. Nach einmaliger oder mehrmaliger rhBMP7-Zugabe kam es zu tendenziell reduktiven Effekten auf die Spp1-Genexpression. Hier zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle am gleichen Tag für die einfache rhBMP7-Stimulation am 10. Tag Erniedrigungen um den 1,8-fachen bis 1,9-fachen Wert der Spp1-Expression und für die multiple rhBMP7-Applikation am 7. Tag Verringerungen auf ein 1,8-faches bis 2,2-faches Expressionsniveau.

Für die Spp1-Expressions-Entwicklung im Fibroblasten-Bereich ergab sich analog zum Osteoblasten-Bereich für die unstimulierten Kontrollen sowohl im singulären als auch im multiplen rhBMP7-Stimulationsansatz ein natürlicher, rhBMP7-unabhängiger Anstieg der Genexpression von Spp1. So kam es im singulären Stimulationsversuch nach 10 Tagen zu einem 2,7-fachen Spp1-Expressionsprogress und in der mehrfachen rhBMP7-Hinzugabe zu einer 3,0-fachen Steigerung besagter Spp1-Expression. Ebenfalls korrelierend zum Osteoblasten-Bereich zeigten die rhBMP7-Applikation im Fibroblasten-Bereich in der Tendenz eher expressionsreduktive Effekte. So konnten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle für den multiplen Stimulationsansatz Reduktionen des Spp1-Genexpressionsniveau um den 2,5-fachen Wert, um den 2,1-fachen Wert oder den 4,5-

fachen Wert für die Konzentrationen von 100 ng/ml, von 250 ng/ml und von 500 ng/ml rhBMP7 nachgewiesen werden.

Auch im Interface-Bereich zeigte sich ohne rhBMP7-Einfluss ein Anstieg der Spp1-Genexpression. Hier kam es im multiplen rhBMP7-Stimulationsansatz zu einer Erhöhung auf den 1,8-fachen Wert beziehungsweise auf den 1,9-fachen Wert für die Zeitpunkte 7 Tage und 10 Tage. Weiterhin ergaben sich im Interface-Bereich passend zum Osteoblasten-Bereich und zum Fibroblasten-Areal tendenziell eher suppressive Wirkungen der rhBMP7-Stimulation auf die Spp1-Genexpression. So resultierte exemplarisch für die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP7 im multiplen Stimulationsversuch eine 2,1-fache Spp1-Expressionsverringering im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

In der Zusammenfassung der experimentellen Spp1-Expressionsdaten zeigten sich in allen drei Bereichen zeitliche Anstiege der Spp1-Expressionen auf 2-fache Werte bis 3-fache Werte nach einer Versuchsdauer von 10 Tagen. Dieser Sachverhalt unterstützt die Hypothese, dass es bei den Zellen im Fibroblasten-Bereich zu einer Ausbildung osteogener Eigenschaften – wie in Cho *et al.* (2017) und Yamamoto *et al.* (2015) mit der Transdifferenzierung fibroblastischer Zellen zu funktionsfähigen Osteoblasten beschrieben – kommt. Sowohl durch die singuläre rhBMP7-Stimulation als auch durch die multiple Applikation von rhBMP7 werden die physiologischen Entwicklungen der Osteoblasten und Fibroblasten nicht oder nur geringgradig beeinflusst. So zeigten die hier vorliegenden Versuche sogar einen tendenziell eher suppressiven Effekt von rhBMP7 auf die Spp1-Genexpression. Diese Ergebnisse widersprechen den Beobachtungen von Shen *et al.* (2010), welche verstärkende Effekt von rhBMP7 auf die Spp1-Expression beschrieben. Auch in Rickard *et al.* (1994) wird eine Induktion der Spp1-Genexpression durch Mitglieder der BMP-Familie beschrieben, was im Kontrast zu den dieser Arbeit gewonnenen experimentellen Daten steht.

4.5 Die Bglap-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation

Bglap codiert für das Protein Osteocalcin, ein humanes, aus 49 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon. Nach Cohen (2006) kommt es im Rahmen der Differenzierung eines Prä-Osteoblasten zum funktionalen Osteoblasten nach der Erhöhung der Col1a1-, Alp1- und Spp1-Expression letztlich auch zur gesteigerten Expression von Osteocalcin alias Bglap. Während es sich nach Luu *et al.* (2006) und Weinreb *et al.* (1990) bei Alp1 um einem frühen bis mittleren osteogenen Differenzierungsmarker und bei Spp1 um einem mittleren bis späten osteogenen Differenzierungsmarker handelt, konnten Arbeiten von Khurana (2016) zeigen, dass Bglap als Markergen für die späte und nahezu finale osteogene Differenzierung zum reifen Osteoblasten und letztendlich zum Osteozyten herangezogen werden kann.

Wie im Kapitel **3.5 Die Bglap-Genexpression nach rhBMP7-Stimulation** ausführlich beschrieben wurde, zeigten sich in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten expressionsverstärkende Effekte von rhBMP7 auf die Bglap-Genexpression. In den unstimulierten Kontrollen, welche die Entwicklung der Bglap-Expression ohne rhBMP7-Wirkung aufzeigten, ergaben sich sowohl im Osteoblasten-Bereich als auch im Fibroblasten-Bereich und im Interface-Bereich zeitabhängige Hochregulierungen der Bglap-Genexpression. So kam es für die Kontrollen am Zeitpunkt 10 Tage im Osteoblasten-Bereich zu einer 28,4-fachen (bei singulärer rhBMP7-Stimulation) beziehungsweise zu einer 91,8-fachen (bei der multiplen rhBMP7-Stimulation) Erhöhung der Bglap-Genexpression. Im Fibroblasten-Bereich resultierte eine 14,7-fache (bei singulärer rhBMP7-Stimulation) respektive eine 8,2-fache (bei multipler rhBMP7-Stimulation) Steigerung der Bglap-Genexpression. Für den Interface-Bereich konnte ein 14,0-facher (bei singulärer rhBMP7-Stimulation) beziehungsweise ein 13,1-facher Anstieg (bei multipler rhBMP7-Stimulation) der Bglap-Genexpression beobachtet werden. Obwohl sich damit bereits in den unstimulierten Kontrollen ausgeprägte, zeitabhängige Steigerungen der Bglap-Expressionsniveaus zeigten, konnten diese Genexpressionslevel durch rhBMP7-Hinzugabe noch zusätzlich gesteigert beziehungsweise potenziert werden. Die dabei nachgewiesenen Effekte waren sowohl dosisabhängig als auch von der Anzahl der Stimulationen abhängig.

So zeigte sich im Osteoblasten-Bereich am 10. Tag für die rhBMP7-Konzentration von 500 ng/ml und nach einmaliger Stimulation eine 45,6-fach erhöhte Bglap-Genexpression, was im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle am Tag 10 einer 2,6-fachen Steigerung des Bglap-Expressionslevels bedeutete. Für die multiple Applikation von rhBMP7 ergaben sich am entsprechenden 10. Tag der Versuchsdurchführung einmal mehr erhöhte Werte mit einer

205,3-fachen Bglap-Genexpressionszunahme, was einer 4,1-fachen Erhöhung der Bglap-Werte bezogen auf die unstimulierte Kontrolle am 10. Tag entsprach.

Im Fibroblasten-Bereich resultierte für die singuläre Stimulation mit einer Konzentration von 500 ng/ml rhBMP7 nach 10 Tagen eine Bglap-Genexpressionserhöhung um das 42,8-fache, was einer 2,0-fachen Steigerung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle entsprach. Bei multipler rhBMP7-Stimulation ergaben sich nochmals gesteigerte Bglap-Expressionswerte mit einer Zunahme auf den 232,5-fachen Wert, welcher in Relation zur unstimulierten Kontrolle gleichbedeutend mit einem 11,5-fachen Anstieg der Bglap-Genexpression war.

Für die Zellen im Interface-Bereich zeigten sich ebenfalls durch rhBM7-Hinzugabe zeitabhängige und dosisabhängige positive Auswirkungen auf die Bglap-Expression, wobei die Ausprägungen im Vergleich zu den Werten für den Osteoblasten-Bereich und den Fibroblasten-Bereich niedriger ausfielen. Hier ergab für beispielsweise die Konzentration von 500 ng/ml rhBMP7 nach 10 Tagen ein 8,5-fachen Anstieg des Bglap-Genexpressionsniveaus im singulären Stimulationsansatz und eine 11,2-fache Zunahme der Bglap-Expression im multiplen Stimulationsversuch, was im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen einer 1,5-fachen Zunahme des Bglap-Expressionslevels in der einmaligen rhBMP7-Hinzugabe oder einer 1,2-fachen Bglap-Expressionssteigerung bei der mehrfachen rhBMP7-Applikation entsprach.

Insgesamt resultierten in den vorliegenden Experimenten bereits ohne rhBMP7-Stimulation signifikante und zeitabhängige Steigerungen der Bglap-Expression, was als Zeichen einer fortschreitenden osteogenen Differenzierung der untersuchten Zellen zu interpretieren ist. Insbesondere zeigten sich auch im Fibroblasten-Bereich und im Interface-Bereich progrediente Bglap-Genexpressionsniveaus, weshalb in diesen Bereich neben der Migration von einiger osteoblastischen Zellen aus dem Osteoblasten-Bereich auch eine Transdifferenzierung der Fibroblasten hin zu Zellen mit osteogenen Eigenschaften stattfinden muss.

Diese Erkenntnisse decken sich mit den Arbeiten von Cho *et al.* (2017) und Yamamoto *et al.* (2015), welche ebenfalls die Fähigkeit von Fibroblasten zur Transdifferenzierung zu funktionsfähigen Osteoblasten beschrieben. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse eine deutliche, zeitabhängige und dosisabhängige Wirkung von rhBMP7 auf die Bglap-Expression in Osteoblasten und Fibroblasten. Während es in den Zellen im Osteoblasten-Bereich und Fibroblasten-Bereich zu einer direkten, stark expressionssteigernden Wirkung kommt, zeigen sich die Effekte von rhBMP7 im Interface-Bereich vergleichsweise später und reduzierter. Dies begründet sich am ehesten damit, dass im initial zellleeren Interface-

Bereich im ersten Abschnitt des untersuchten Zeitraumes eine Migration der osteoblastischen Zellen und der fibroblastischen Zellen sowie dessen Proliferation zu einer konfluenten Zellschicht stattfindet, wonach erst die Differenzierung der Zellen eingeleitet wird. Somit befinden sich die Zellen im Interface-Bereich in einem zeitlich verzögerten Entwicklungsstand und sind verglichen zu den Zellen im Osteoblasten-Bereich und Fibroblasten-Bereich noch nicht (soweit) ausdifferenziert. Daher erscheint die Bglap-Genexpression im Interface-Bereich vergleichsweise niedriger, verspätet beziehungsweise verlangsamt. Die hier nachgewiesenen positiven Effekte von rhBMP7 auf die Bglap-Expression in Osteoblasten werden von Wu *et al.* (2016) und Hyung *et al.* (2017) unterstützt, die ebenfalls eine direkte Wirkung der BMP-Mitglieder auf die Osteocalcin-Expression nachwiesen. Weiterhin konnten auch Wu *et al.* (2016) und Jun *et al.* (2018) die in dieser Arbeit beobachtete, dosisabhängige rhBMP7-Wirkung auf die Bglap-Genexpression nachweisen.

4.6 Die histologischen Veränderungen nach rhBMP7-Stimulation

Im Abschnitt *3.6 Die histologischen Veränderungen nach rhBMP7-Stimulation* wird detailliert auf die histologischen Veränderungen im Osteoblasten-Bereich, im Fibroblasten-Bereich und im Interface-Bereich nach einmaliger und mehrmaliger Applikation von rhBMP7 eingegangen und beruhend auf den mikroskopischen Beobachtungen eine semi-quantitativen Analyse durchgeführt.

Hier zeigten sich in den unstimulierten Kontrollen bis zum 7. Tag sukzessive Verringerungen der freien Interface-Flächen auf einen einstelligen Prozentsatz mit 2,3% der Interface-Gesamtfläche. Desweiteren ergab sich ab dem Zeitpunkt Tag 9 ein vollständig mit migrierten beziehungsweise proliferierten Zellen gefüllter Interface-Bereich.

Dieser Einwachsungsprozess zeigte sich in den singulären und multiplen rhBMP7-Stimulationen mit einer Konzentration von 500 ng/ml rhBMP7 deutlich beschleunigt. So ergab sich für die einmalige rhBMP7-Stimulation am 6. Tag der Versuchsdurchführung – also einen Tag früher als bei der Kontrolldurchführung – eine Reduktion der freien Fläche auf einen einstelligen Prozentsatz mit 3,0% der Interface-Gesamtfläche. Ebenfalls kam es schon am 7. Tag der Experimente zu einer vollständigen Interface-Flächenfüllung in der singulären rhBMP7-Stimulation, was einer um zwei Tagen früheren Entwicklung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gleichkommt.

Im Rahmen der multiplen Stimulation mit 500 ng/ml rhBMP7 zeigte sich ebenfalls eine beschleunigte Migration beziehungsweise eine akzelerierte Proliferation von Zellen in den Interface-Bereich. Eine Reduktion der Interface-Fläche auf einen einstelligen Prozentsatz mit 5,3% ließ sich bereits nach 5 Tagen der experimentellen Durchführung nachweisen, wobei ein vollständiger Flächenschluss im Interface-Bereich am 6. Tag der Versuche beobachtet werden konnte. Damit zeigte sich die multiple rhBMP7-Stimulation der singulären rhBMP7-Stimulation zeitlich einen Tag und im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen gar um drei Tage voraus.

Somit resultiert in der Gesamtschau der semi-quantitativen Auswertung der histologischen Veränderungen eine positive, zeitabhängige und dosisabhängige rhBMP7-Wirkung auf die Osteoblasten und Fibroblasten. Es ergab sich eine beschleunigte Migration in den Interface-Bereich und damit verbunden eine erhöhte Proliferationsrate in diesem Areal, weshalb von einer schnelleren Ausbildung der Osteoblasten-Fibroblasten-

Interaktion beziehungsweise Zell-Zell-Verbindung und damit von einer akzelerierten Knochen-Sehnen-Einheilung durch rhBMP7-Stimulation ausgegangen werden kann.

4.7 Methoden-Etablierung und Zusammenfassung der rhBMP7-Wirkung

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde ein an Wang *et al.* (2007) angelehntes Co-Kultur-Modell entwickelt, dessen konzeptioneller Aufbau detailliert im Unterkapitel **1.6.3 Studien-Aufbau und konzeptionelle Versuchsplanung** beschrieben wird.

Um ein Hochdurchsatz-Verfahren mit der Generierung hoher Zellzahlen zu ermöglichen, wurde mit der prä-osteoblastischen Zelllinie MC3T3-E1 und der fibroblastischen Zelllinie 3T3 sekundäre, immortalisierte murine Zellen anstelle der in Wang *et al.* (2007) verwendeten primären Zellen eingesetzt. In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten konnte durch die Passagierung der zuvor genannten Zelllinien genügende Mengen an Osteoblasten- und Fibroblasten-Zellen generiert werden, um die benötigten Co-Kultivierungs-Ansätze in statistisch relevanter Quantität und mit multiplen biologischen und technischen Replikaten durchzuführen.

Im Gegensatz zu Wang *et al.* (2007) war es bei den zuvor genannten Zelllinien jedoch nicht möglich, eine unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der MC3T3-E1-Zellen und der 3T3-Zellen durchzuführen, da sich durch diese Fluoreszenzmarker-vermittelte Kennzeichnung ein toxischer und deahärierender Effekt ergab, was letztendlich zu einer stark reduzierten Zellausbeute in der durchflusszytometrischen Zell-Sortierung resultierte. Ersatzweise erfolgte die Trennung der Zellen aus dem Osteoblasten-, Fibroblasten- und Interface-Bereich durch eine vorsichtige, manuelle Ablösung der Zellen mit Hilfe von Zellschabern. In diesem Zusammenhang konnte mikroskopisch gezeigt werden, dass erst nach Entfernung des Agarose-Dividers im Interface-Bereich eine Migration der osteoblastischen und fibroblastischen Zellen in den besagten Bereich erfolgte. Daher konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der genutzten Agarose-Schicht um eine solide Möglichkeit zur temporären räumlichen Trennung unterschiedlicher Zellen handelt.

Die in den Co-Kultivierungs-Versuchen verwendeten Zwei-Kammer-Systeme ergaben ausreichende Zellzahlen und damit genügend zelluläres Material für die nachfolgende Transkriptom-Extraktion, für die photometrische RNA-Quantifikation und die cDNA-Bibliothek-Erstellung mittels RT-PCR. Weiterhin zeigten sich die anschließende qRT-PCR als geeignete Methode zur Analyse signifikanter Veränderungen der in **1.6.3 Studien-Aufbau und konzeptionelle Versuchsplanung** genannten Marker-, Referenz- und Housekeeping-Gene.

Hinsichtlich der molekularbiologischen Wirkungen von rhBMP7 auf die osteoblastischen und fibroblastischen Zellen zeigten sich zahlreiche Veränderungen auf die Expressionsrate der untersuchten Gene.

Für die Runx2-Genexpression zeigten sich nur geringe Auswirkungen beziehungsweise nicht signifikante Effekte auf die untersuchte osteoblastische Zellfraktion. Eine rhBMP7-Stimulation führte nur zu einer temporären Erhöhung der Runx2-Expression in Osteoblasten, wobei nach dieser initialen Steigerung – vermeintlich über intrazelluläre negative Feedback-Regulationen und Rückkopplungsmechanismen – ein Zurücksetzen auf ein konstantes Niveau erfolgte. Da es sich bei Runx2 um einen Transkriptionsfaktor mit der Aufgabe der Initiation beziehungsweise der Induktion der osteogenen Differenzierung handelt, legten die Beobachtungen nahe, dass es sich um eine „On-Off“-Regulation handelt. So führt eine einmal begonnene Aktivierung von Runx2 in pluripotenten Stammzellen zum Einschlagen eines osteogenen Differenzierungsweges und zur Aktivierung unterschiedlicher Gen-Transkriptionen, unabhängig von der Expressionsstärke von Runx2. Dabei scheint die Runx2-Expression nicht über Mitglieder der BMP-Subfamilie wie rhBMP7 reguliert zu sein. Vielmehr wird die Regulierung über andere Mechanismen auf Gen-Ebene oder Protein-Ebene gewährleistet. Diese Beobachtungen decken sich mit den Publikationen von Carbonare *et al.* (2012), Hassan *et al.* (2010), Lee *et al.* (2000) und Jonason *et al.* (2009), in denen ebenfalls konstante Runx2-Genexpressionsniveaus in Osteoblasten trotz unterschiedlicher Stimuli-Exposition postuliert wurden und diesbezüglich DNA-Methylierungen, Protein-Aktivierungen und -Inaktivierungen sowie Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse als Regulationsmechanismen für Runx2 diskutiert werden.

Das zuvor beschriebene „Alles-oder-Nichts“-Prinzip zur Einleitung einer osteogenen Differenzierung über den Transkriptionsfaktor Runx2 erklärt auch die in den vorliegenden Experimenten beobachtete Wirkung von rhBMP7 auf die fibroblastischen Zellen. Während in den unstimulierten Kontrollen der Fibroblasten Runx2 nicht nachweisbar ist, führt die Stimulation mit rhBMP7 zu einer Induktion der Runx2-Genexpression in den besagten fibroblastischen Zellen. Dabei bewirkt die rhBMP7-Applikation die osteogene Differenzierung über den Runx2-Signaltransduktionsweg in den Fibroblasten, wobei sich die Runx2-Genexpressionslevel vermutlich über die zuvor bereits für die Osteoblasten beschriebenen, intrazellulären Rückkopplungsmechanismen auf ein konstantes Niveau stabilisieren. Die vorliegenden Daten implizieren diesbezüglich, dass die Initiation der osteogenen Entwicklung abhängig von der rhBMP7-Dosis ist. Hier zeigen höhere Applikationsmengen schnellere Einflüsse auf die Bildung von Runx2 und damit eine

beschleunigte Ausbildung osteogenen Eigenschaften in den untersuchten Fibroblasten. Diese Veränderungen der Fibroblasten, die sich anteilig auch im Interface-Bereich als Zeichen für die Migration von fibroblastischen Zellen in diesen Interaktionsbeziehungsweise Schnittstellen-Bereich zeigen, deuten die Möglichkeit der Transdifferenzierung dieser Zellen an. Die Beobachtungen im Fibroblasten-Bereich und im Interface-Bereich widersprechen damit dem Dogma der unidirektionalen Differenzierung pleuripotenter Zellen zu immer weiter (aus-)differenzierten Zellen. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die These, dass fibroblastische Zellen in der Lage sind, osteogene Eigenschaften auszubilden. Diese Ergebnisse werden in der Literatur von Cho *et al.* (2017) und Yamamoto *et al.* (2015) bekräftigt, die ebenfalls eine durch unterschiedliche chemische oder molekularbiologische Stimuli verursachte Transdifferenzierung von Fibroblasten untersuchten. Damit würde die Knochen-Sehnen-Heilung hauptsächlich von den fibroblastischen Zellen im Sehnen-Gewebe ausgehen, welche sich anteilmäßig in der Kontaktzone zum Knochen zu Knochengewebe umorganisieren beziehungsweise zu funktionsfähigen Osteoblasten transdifferenzieren.

Durch die rhBMP7-Stimulation kommt es bezogen auf die Col1a1-Expression zu unterschiedlichen Effekten sowohl in den Osteoblasten als auch den Fibroblasten, wenngleich die beobachteten Wirkungen in den osteoblastischen Zellen stärker ausgeprägt auftraten. So implizieren die in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Versuchen eine Expressionssteigerung von Col1a1 und somit einer Verstärkung der Kollagen-Synthese durch rhBMP7, wobei eine oder mehrere erneute rhBMP7-Applikationen zu einer Störung dieser initiierten Kollagen-Synthese führen und in einer Reduktion der Col1a1-Genexpression resultieren. So scheint es, dass rhBMP7 die osteogene, Runx2-vermittelte Differenzierung einleitet und die Kollagen-Synthese über Col1a1-Expressionssteigerung vom Prä-Osteoblasten zum frühen Osteoblasten erhöht wird. Wie auch immer, führt eine mehrfache Stimulation mit rhBMP7 zur einer Art Stagnation beziehungsweise zum Zurücksetzen der ansteigenden Col1a1-Genexpression. Da sich keine korrelierenden Veränderungen in der Runx2-Expression zeigten, ist dieser Effekt vermutlich auf die Wirkung anderer Signaltransduktionswege zurückzuführen, die durch die rhBMP7-Substitution aktiviert werden. In der Literatur wird in diesen Zusammenhang ein komplexes Netzwerk von Signalwegen beschrieben, wobei neben dem Runx2-vermittelten Signaltransduktionsweg beispielsweise dem Wnt/ β -Catenin-Pathway oder dem FGF-Signalweg große Bedeutung während der Osteoblasten-Differenzierung zukommt (Huang *et al.*, 2007) und dessen zeitliche Abstimmung und Abfolge kritisch für die korrekte osteogene Differenzierungskaskade ist (Duan *et al.*, 2016).

Bezüglich der Alp1-Genexpression zeigen sich die aus den vorliegenden Versuchen resultierenden Ergebnisse stimmig zu den in der Literatur beobachteten Auswirkungen von rhBMP7. Xue *et al.* (2015) und Yeh *et al.* (2002) berichteten beide von einer durch rhBMP7 induzierte osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen mit deutlicher Steigerung der Alp1-Genexpression. Die bereits in der Kontrollgruppe nachweisbaren Alp1-Genexpressionssteigerungen wurden durch die rhBMP7-Applikationen in dosisabhängiger und anzahlabhängiger Form beeinflusst, so dass eine zusätzliche Erhöhung beziehungsweise Potenzierung der Genniveaus zu beobachten waren. Diese Induktion der Alp1-Genexpression, die auch von Kim *et al.* (2018) und Aoki *et al.* (2001) beschrieben wurden, ist auch in den fibroblastischen Zellen nachweisbar, was analog zum Runx2-Nachweis in den untersuchten Fibroblasten die These der Transdifferenzierung der Fibroblasten zu funktionsfähigen Osteoblasten unterstützt (gemäß Cho *et al.*, 2017 und Yamamoto *et al.*, 2015). Fathima *et al.* (2015) und Kawase *et al.* (1998) kamen zu ähnlichen Ergebnissen und beobachteten osteostimulatorische Effekte für fibroblastische Zellen, die unter anderem eine Steigerung der alkalischen Phosphatase-Aktivität beinhalteten.

In der Literatur beschreiben Shen *et al.* (2010) und Cheifetz *et al.* (1996) eine Hochregulierung von Spp1 und Bglap durch BMP7-Supplementierung. Die vorliegenden Daten zeigten analoge Ergebnisse für die Bglap-Genexpression, die genauso wie die Alp1-Expression durch die rhBMP7-Stimulation dosisabhängig und anzahlabhängig erhöht wurde. Im Gegensatz dazu waren in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten keine Spp1-Genexpressionsanstiege durch rhBMP7-Applikation nachweisbar, hier zeigten sich eher suppressive beziehungsweise reduktive oder stagnierende Tendenzen.

Histologisch ergab sich durch die rhBMP7-Stimulation passend zu den beobachteten Hochregulierungen von knochenbildenden Marker-Genen eine beschleunigte Interaktion von Osteoblasten-Zellen und Fibroblasten-Zellen und eine damit verbundenen akzelerierte Knochen-Sehnen-Integration. Dabei zeigte ebenfalls ein dosisabhängiger und anzahlabhängiger rhBMP7-Effekt.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit ein praktikables Co-Kultur-Modell zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen auf molekularbiologischer Ebene installiert und damit eine Methode zur Untersuchung der Knochen-Sehnen-Einheilung nach Stimulationen mit unterschiedlichen Faktoren oder Substanzen etabliert werden. Für das in dieser Arbeit eingesetzte rekombinante, humane BMP7 ließen sich förderliche Effekte auf die Knochen-Sehnen-Integration nachweisen. Neben einer verstärkten Bildung von knochenspezifischen

beziehungsweise knochenmatrixspezifischen Proteinen durch verstärkte Expression von osteogenen Marker-Genen zeigte sich auch die Ausbildung osteogener Eigenschaften für die untersuchten Fibroblasten im Sinne einer Transdifferenzierung zu funktionsfähigen Osteoblasten. Diese Möglichkeit der Transdifferenzierung ist in der gängigen Literatur kontrovers diskutiert, wobei die hier vorliegenden Daten diese Wandlung von Fibroblasten zu funktionsfähigen Osteoblasten unterstützen. Die zudem durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen bekräftigen diese Ergebnisse durch den Nachweis einer beschleunigten Interaktion der Zellen mit akzelerierter Migration der beteiligten osteoblastischen Zellen und fibroblastischen Zellen in den Interface-Bereich.

5. Ausblick

Die Orthopädie und Unfallchirurgie beschäftigt sich zu einem wesentlichen Anteil mit degenerativen oder traumatischen Rupturen beziehungsweise Ausrissen von Sehnen oder Bändern und versucht, durch die Gewährleistung einer korrekten Einheilung ein funktionell bestmöglichstes Ergebnis für Patienten zu erzielen. In allen zuvor genannten Feldern spielt die Interaktion von Zellen, insbesondere von Knochen-Zellen und Sehnen-Zellen, eine herausragende Rolle. Trotz intensiver Forschung sind die biologischen Abläufe und die molekularen Mechanismen dieser Interaktion besagter Zellen und damit auch die Prozesse der Knochen-Sehnen-Einheilung bisweilen unzureichend verstanden. Sowohl für die optimale Behandlung als auch für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte sind die genauen Kenntnisse der molekularen Grundlagen der zellulären Interaktion essentiell.

Die vorliegende Promotionsarbeit konnte einen Beitrag zum Verständnis der Knochen-Sehnen-Einheilung beisteuern und zeigte Anhaltspunkte für die Möglichkeit der Transdifferenzierung von fibroblastischen Zellen zu funktionsfähigen Osteoblasten. Dennoch bedarf es weiterer Forschung zum besseren Verständnis der ossären Sehnen-Integration und der Abläufe der Zell-Zell-Interaktionen.

Aufbauend auf dem in dieser Promotionsarbeit etablierten Co-Kultur-Modell könnten weitere Verbesserungen des methodischen Ansatzes erfolgen, um eine leichtere Handhabung zu gewährleisten, um die statistische Signifikanz zu erhöhen oder um mehrere, parallele Untersuchungen durchzuführen. Hier könnte das Zwei-Kammer-System mit temporärer Agarose-Trennschicht durch speziell für Co-Kultivierungen vorgesehen Gewebescheiden ersetzt werden. Diesbezüglich wäre es theoretisch denkbar, Gewebescheiden mit einem mittigen, erhabenen Relief – einer Art „Anhöhe“ – einzusetzen, wodurch an den beiden zu dieser Erhöhung angrenzenden Seiten eine Art „Tiefebene“ entsteht, in denen unterschiedliche Zellarten beziehungsweise Zelllinien ausgesät werden könnten. Dabei würden initial nur die beiden Seiten mit den Zellen mit Kulturmedium gefüllt, so dass das mittige, erhabene Relief einen natürliche Trenner ohne Kulturmedium-Bedeckung darstellt. Nachdem sich ein konfluentes Wachstum der Zellen auf beiden Seiten eingestellt hat, könnte durch die zusätzliche Zugabe von Kulturmedium bis über das Niveau des besagten Reliefs ein neuer Bereich entstehen, der für Einwachsungsprozesse und zelluläre Interaktionen freigeben beziehungsweise zur Verfügung steht.

Sowohl das in den vorliegenden Versuchen etablierte Co-Kultur-Modell als auch in der zuvor beschriebenen abgewandelten, verbesserten Variante besteht der Nachteil, dass initial keine direkten Zell-Zell-Interaktion vorhanden ist. Für beide Modelle ist zuerst das Einwachsen der Zellen in den Interface-Bereich Voraussetzung für eine direkte Interaktion, weshalb bis zu diesem Zeitpunkt nur eine indirekte, parakrine oder autokrine Zell-Zell-Kommunikation möglich ist. In der Sehnen-Chirurgie wird jedoch immer versucht, über operative Methoden eine direkte Verbindung beziehungsweise einen unmittelbaren Kontakt des Sehnen- oder Bandgewebes mit dem Knochengewebe zu gewährleisten, wobei beispielsweise Endobuttons, Fadenanker oder Interferenzschrauben verwendet werden. In den zuvor genannten methodischen Ansätzen ist jedoch keine direkte Zell-Zell-Interaktion der untersuchten Zellen möglich oder realisierbar. Um eine solche direkte Verbindung zu simulieren, könnte das Co-Kultur-Modell dahingehend verändert werden, dass zur Anzucht der Zellen Membranfilter genutzt werden, auf welchen die Zellarten adhätierend konfluent wachsen könnten. Um die direkte Zell-Zell-Kommunikation zu untersuchen, könnten anschließend die beiden Membranfilter der beiden zu untersuchenden Zellen im Sinne eines „Sandwich“ zusammengebracht beziehungsweise aufeinander gelegt werden, wobei nach anschließender Kultivierung und vorsichtiger Trennung der Zellen die Analyse der direkten zellulären Interaktion möglich wäre.

In den vorliegenden Versuchen stellten sich die Schritte beginnend von der Zellernte bis hin zur quantitativen real-time PCR-Analyse – genauer gesagt also die Lyse und Aufreinigung der Zellen, die Extraktion und Quantifizierung der genomischen RNA sowie die cDNA-Synthese mit anschließender qRT-PCR-Durchführung – als zeitlich sehr aufwändig dar, wodurch eine Kapazitätserweiterung oder Parallelisierung der Versuche schwierig erscheint. Diesbezüglich erscheint eine Steigerung der Effizienz und damit eine Erhöhung der parallel durchführbaren Experimente durch Verwendung der so genannten Kolonie-PCR (engl. colony PCR) möglich. Bei dieser Methode werden direkt die aus dem Kulturmedium entnommenen Zellkulturen anstelle der normalerweise verwendeten, zuvor aufwendig aufgereinigten DNA-Moleküle als Template eingesetzt. Dabei erfolgt die Lyse der Zellen über den initialen Erhitzung-Schritt im PCR-Programm, wodurch es zur Freisetzung der zellulären DNA und RNA kommt. Um in diesem Zusammenhang das aktuelle Transkriptom und nicht das Genom zu analysieren, müsste gewährleistet werden, dass mRNA-spezifische Primer eingesetzt werden. Um diese Bedingung zu garantieren, könnten die Primer-Designs Exon-Intron-Grenzen-überspannend ausgelegt werden, so dass eine Primer-Anlagerung nur an Transkripte, jedoch nicht an genomische DNA erfolgt. Abzuwarten wäre, ob diese Vereinfachung der methodischen Schritte einerseits zu einer

ausreichenden cDNA-Menge und andererseits zu statisch evaluierbaren und validen Daten führen würde, da hier zahlreiche Störfaktoren wie beispielsweise etwaige Verunreinigungen auftreten oder Inhaltsstoffe des Kulturmediums oder der Zellkultur hemmende Einflüsse auf den Ablauf der RT-PCR nehmen könnten.

Weiterhin könnte in den zukünftigen Forschungsarbeiten die in dieser Promotion analysierten Osteoblasten-Markergene Runx2 (Initiator-Marker), Col1a1 (früher Marker), Alp1 (früher bis mittlerer Marker), Spp1 (mittlerer bis später Marker) und Bglap (später bis finaler Marker) um weitere Markergene erweitert werden. Da sich in dieser Arbeit der Verdacht äußerte, dass die fibroblastischen Zellen eine Umwandlung zu funktionsfähigen Osteoblasten erleben, wäre die Analyse der gegenläufigen Entwicklung höchst interessiert. Diesbezüglich liegt es also nahe, in weiterführenden Untersuchungen zu evaluieren, ob die beteiligten osteoblastischen Zellen auch zur Entwicklung fibroblastischer Eigenschaften im Stande sind. So könnten Versuche unter Verwendung von Fibroblasten-spezifischen Markergenen zeigen, ob es ohne rhBMP7-Applikation oder mit rhBMP7-Stimulation auch zu einer Ausbildung fibroblastischer Charakteristika bei den osteoblastischen Zellen kommt. Durch diese weiteren Experimente könnte gezeigt werden, ob die Knochen-Sehnen-Einheilung entweder von den Sehnen-Zellen oder von den Knochen-Zellen ausgeht beziehungsweise ob beide Zelltypen und falls ja zu welchen Anteilen an der Knochen-Sehnen-Einheilung beteiligt sind. Dadurch könnte ein weiterer Einblick in die Erforschung der ossären Sehnen-Integration geschaffen und ebenso Ansatzpunkte für mögliche Behandlungs- oder Therapiekonzepte entdeckt werden.

Im Rahmen der Kreuzband-Chirurgie ist bekannt, dass die Verbindung von Kreuzband und Knochen durch eine direkte, fibrokartilaginäre Bandinsertion gewährleistet wird. Hier lassen sich histologisch vier Zonen abgrenzen, wobei zwei dieser Zonen knorpelartige Eigenschaften – die Faserknorpel-Zone und die Kalkknorpel-Zone – aufweisen. Unter Berücksichtigung dieser knorpeligen Anteile der direkten Bandinsertion sollten neben den zuvor genannten Analyse von Fibroblasten-spezifischen Zielgenen auch Untersuchungen unter Verwendung von Markergenen der Knorpel-Entwicklung durchgeführt werden, in der Hoffnung, neue Kenntnisse zur Interaktion von Osteoblasten, Fibroblasten und Chondroblasten zu generieren.

Um die gewonnenen Ergebnisse besser interpretieren zu können, sind darüber hinaus neue Studien mit Anwendung anderer knochen-, knorpel- oder sehnen-proliferativer Substanzen notwendig, wobei das hier etablierte Modell als methodische Grundlage dienen

kann. Damit könnten ebenfalls vergleichende Untersuchungen durchgeführt werden, in denen Kombinationen von osteoinduktiven Substanzen eingesetzt werden.

Abschließend kann postuliert werden, dass die Knochen-Sehnen-Integration aktuell noch nicht ausreichend verstanden ist, obgleich dieser Bereich Gegenstand zahlreicher aktueller Forschungsprojekte ist. Dabei zeigen unterschiedliche Studien deutlich, dass eine positive Beeinflussung durch osteoinduktive oder chondroinduktive Substanzen wie die Mitglieder der BMP-Subfamilie inklusive des in dieser Promotionsarbeit untersuchten Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP7) möglich ist. Die genauen Wirkmechanismen solcher stimulierenden Faktoren oder Stoffe sind bis heute bedauerlicherweise nur lückenhaft verstanden, so dass es zum besseren Verständnis und zur medizinischen Anwendung weiterer intensiver Forschung bedarf.

Insgesamt stellt das komplexe Netzwerk der Signaltransduktionskaskaden und der Zell-Zell-Kommunikation ein höchst interessantes und weitläufiges Forschungsgebiet dar, in dem sich viele Grundlagenforscher, Spezialisten und Anwender in naher Zukunft große Fortschritte erhoffen. Diese sollten letztendlich auch dazu führen, dass nicht nur in der Kreuzband-Chirurgie und damit nicht nur in der Disziplin der Orthopädie und Unfallchirurgie neue therapeutische Behandlungsansätze oder kurative Therapiekonzepte entwickelt werden können, sondern dass die gewonnenen Erkenntnisse darüber hinaus zu einem besseren und vollständigeren Verständnis der humanen Physiologie und Molekularbiologie beitragen.

6. Tabellenverzeichnis

Die nachfolgende Auflistung stellt die in dieser Arbeit abgebildeten Tabellen in chronologischer Sortierung dar.

Tabelle	Beschriftung	Seite
Tabelle 1	Translations-Freiheitsgrade und Rotations-Freiheitsgrade des menschlichen Kniegelenkes	12
Tabelle 2	Sensitivität und Spezifität klinischer VKB-Tests nach * Benjaminse et al. (2006) und ** Massey et al. (2017)	26
Tabelle 3	Therapie-Entscheidung bei VKB-Rupturen nach GOTS, modifiziert nach Bauer et al. (2010)	30
Tabelle 4	Faktoren für die Transplantatwahl modifiziert nach Buchner et al. (2010)	33
Tabelle 5	Zonen-Unterteilung der fibrokartilaginären Bandinsertion modifiziert nach Apostolakis et al. (2014)	37
Tabelle 6	Überblick über die Smad-Proteinfamilie (modifiziert nach Moustakas et al., 2009)	48
Tabelle 7	Dieser Arbeit zugrundeliegende Stimulations-Ansätze, Untersuchungs-Zeitpunkte und rhBMP7-Konzentrationen	62
Tabelle 8	Anzahl der verwendeten Co-Kultivierungs-Gewebekulturschalen	63
Tabelle 9	Anzahl der verwendeten RNA-Proben	63
Tabelle 10	Anzahl der verwendeten qRT-PCR-Ansätzen	64
Tabelle 11	Eigenschaften der verwendeten osteoblastischen und fibroblastischen Zelllinien	68
Tabelle 12	Zielgene und Referenzgene mit Abkürzungen und vollständigem Namen	70
Tabelle 13	Übersicht über die verwendeten qRT-PCR-Oligonukleotide	70
Tabelle 14	Übersicht über die für die Co-Kultivierung verwendeten Passagen der MC3T3-E1- und 3T3-Zellen	74
Tabelle 15	Volumina an rhBMP7-Stock-Lösung und Differenzierungsmedium zum Erhalt der Versuchsdurchführungs-End-Konzentrationen	79
Tabelle 16	Volumina zur Generierung von cDNA aus genomischer RNA	86

Tabelle	Beschriftung	Seite
Tabelle 17	Inkubations-Protokoll zur Generierung von cDNA aus genomischer RNA	86
Tabelle 18	Volumina zur Herstellung des qRT-PCR-Ansatzes	88
Tabelle 19	Thermozykler-Protokoll zur qRT-PCR	89
Tabelle 20	Übersicht über die verwendeten Signifikanz-Niveaus	91
Tabelle 21	Übersicht über die verwendeten Grafik-Typen	95
Tabelle 22	Übersicht über die prozentuale Interface-Flächenanteile im Rahmen der Mikroskopie-Versuche	152

7. Abbildungsverzeichnis

Sämtliche in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen und Grafiken sind nachfolgend in chronologischer Abfolge aufgelistet.

Abbildung	Beschriftung	Seite
Abbildung 1	Modell der Ursachen von VKB-Verletzungen im Sport (modifiziert nach Gokeler et al. (2010) und Bahr et al. (2005))	22
Abbildung 2	Verletzungs-Kaskade nach VKB-Trauma modifiziert nach Bauer et al. (2010) und Petersen et al. (2010)	28
Abbildung 3	Differenzierungs-Möglichkeiten mesenchymaler Progenitor-Zellen (aus Dirckx et al., 2013)	40
Abbildung 4	Zeitabhängiges Auftreten unterschiedlicher Expressionsmarker im Rahmen der Osteoblasten-Differenzierung (aus Khurana, 2016)	41
Abbildung 5	Übersicht über die Signalmoleküle und Liganden im TGF- β -Pathway (aus Moustakas et al., 2009)	44
Abbildung 6	Übersicht über den TGF- β - und BMP-Pathway und die korrespondierenden Smad-Proteine (aus Moustakas et al., 2009)	49
Abbildung 7	A. Sekundär- und Tertiärstruktur des BMP7-Monomers B./C. Sekundär- und Tertiärstruktur des BMP7-Dimers (aus Rider et al., 2010; Cooper et al., 2012).	50
Abbildung 8	Osteogene Differenzierung und Marker- beziehungsweise Zielgene (modifiziert nach Cohen, 2006)	60
Abbildung 9	Osteogene Differenzierung und Marker- beziehungsweise Zielgene (modifiziert nach Luu et al., 2007)	60
Abbildung 10	Zeitabhängiges Auftreten unterschiedlicher Expressionsmarker im Rahmen der Osteoblasten-Differenzierung (aus Khurana, 2016)	61
Abbildung 11	Schema des Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-Systems	76
Abbildung 12	Schema der Zell-Aussaat in die Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-Systeme	78
Abbildung 13	Schema der Entfernung des Dividers und der rhBMP7-Applikation	79
Abbildung 14	Schema der Zell-Ernte aus den unterschiedlichen Bereichen	80
Abbildung 15	Prinzip der reversen Transkription	85
Abbildung 16	Prinzip der quantitativen real-time PCR	89

Abbildung	Beschriftung	Seite
Abbildung 17	Amplifikations-Verlauf der quantitativen real-time PCR	90
Abbildung 18	Bereichsabhängige Runx2-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	96
Abbildung 19	Zeitabhängige Runx2-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	99
Abbildung 20	Dosisabhängige Runx2-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	102
Abbildung 21	Bereichsabhängige Col1a1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	106
Abbildung 22	Zeitabhängige Col1a1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	109
Abbildung 23	Dosisabhängige Col1a1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	111
Abbildung 24	Bereichsabhängige Alp1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	117
Abbildung 25	Zeitabhängige Alp1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	120
Abbildung 26	Dosisabhängige Alp1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	122
Abbildung 27	Bereichsabhängige Spp1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	129
Abbildung 28	Zeitabhängige Spp1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	131
Abbildung 29	Dosisabhängige Spp1-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	133
Abbildung 30	Bereichsabhängige Bglap-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	138
Abbildung 31	Zeitabhängige Bglap-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	141
Abbildung 32	Dosisabhängige Bglap-Genexpression nach singulärer und multipler rhBMP7-Stimulation	143
Abbildung 33	Die histologischen Veränderungen nach rhBMP7-Stimulation ohne Markierung der Interface-Flächen	150
Abbildung 34	Die histologischen Veränderungen nach rhBMP7-Stimulation mit Markierung der Interface-Flächen	151
Abbildung 35	Absoluter Verlauf der Interface-Flächenanteile in den Kontroll- und Stimulationsansätzen	152

Abbildung	Beschriftung	Seite
Abbildung 36	Verlauf der Interface-Flächenanteile in den Kontroll- und Stimulationsansätzen relativ zum Prozentwert am 1. Tag	153

8. Abkürzungsverzeichnis

Die nachfolgende Tabelle listet die in der vorliegenden Promotionsarbeit angewandten Abkürzungen zusammen mit ihren Bedeutungen und etwaigen Anmerkungen auf, wobei eine lexikographische Ordnung zugrunde gelegt wurde.

Abkürzung	Bedeutung
18S-RNA	Ribosomale RNA, 18S
αMEM	Minimal Essential Medium Alpha Modification
Actb	Beta- / β -Aktin
Alp1	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase 1 (englisch: bone-specific alkaline phosphatase 1)
ALRI	Anterolaterale Rotationsinstabilität
AS	Aminosäure
ATT	Anteriore, tibiale Translation
Bglap	Osteocalcin, Knochenspezifische γ -Carboxylglutamat-Protein (englisch: bone gamma-carboxyglutamate protein)
BMP2	Knochen-morphologisches Protein 2 (englisch: bone morphogenetic protein-2)
BMP7	Knochen-morphologisches Protein 7 (englisch: bone morphogenetic protein-7)
cDNA	Komplementäre DNA (englisch: complementary DNA)
Col1a1	Kollagen Typ 1, Alpha 1-Kette (englisch: collagen type 1, alpha 1 chain)
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium GlutaMAX High Glucose
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: deoxyribonucleid acid)
dsDNA	Doppelsträngige DNA

Abkürzung	Bedeutung
EBM	Evidenz-basierte Medizin (englisch: evidence based medicine)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FB	Fibroblasten
FBS	Fetales, bovines Serum (englisch: fetal bovine serum)
GADP	Glycerolaldehyd-3-Phosphat (englisch: glyceraldehyde 3-phosphate)
HKB	Hinteres Kreuzband (Ligamentum cruciatum posterius)
Hprt1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (englisch: hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1)
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 (insulin-like growth factor-1)
KI	Konfidenzintervall (englisch: confidence interval)
MDB	Membran Desalting Buffer
MRT	Magnetresonanztomographie, umgangssprachlich auch Kernspintomographie
OB	Osteoblasten
OCN	Osteocalcin
OP	Operation
OPN	Osteopontin
PBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction)
PDGF	Plateled-derived growth factor
qRT-PCR	Quantitative real-time-PCR (englisch: quantitative real time PCR)

Abkürzung	Bedeutung
rhBMP7	Rekombinantes, humanes BMP7
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: ribonucleid acid)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR (englisch: reverse transcription PCR)
Runx2	Runt-ähnlicher Transkriptionsfaktor 2 (englisch: runt-related transcription factor 2)
Spp1	Osteopontin, sezerniertes Phosphoprotein 1 (englisch: secreted phosphoprotein 1, osteopontin)
ssDNA	Einzelsträngige DNA (englisch: single-stranded DNS)
ssRNA	Einzelsträngige RNA (englisch: single-stranded RNS)
SURF	surgical risk factor (SURF-Einteilung)
TF	Trankriptionsfaktor (englisch: transcription factor)
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (transforming growth factor-1)
VKB	Vorderes Kreuzband (Ligamentum cruciatum anterius)

9. Literaturverzeichnis

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten und rezierten Literaturquellen in erster Ordnung lexikographisch und in zweiter Ordnung chronologisch aufgelistet. Dabei wurde der englische Begriff des „Volume“ mit „Band“, der Begriff „Issue“ mit „Ausgabe“ und der Begriff „Supplement“ mit „Beilage“ in die deutsche Sprache übersetzt und nachfolgend verwendet.

Nummer	Literaturquelle
1.	Ageberg, E., Roos, H.P., Silbernagel, K.G., Thomée, R., Roos, E.M. (2009). Knee extension and flexion muscle power after anterior cruciate ligament reconstruction with patellar tendon graft or hamstring tendon graft: a cross-sectional comparison 3 years post surgery. <i>Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy</i> , Band 17, Auflage 2, Seite 162-169.
2.	Allen, C.R., Griffin, J.R., Harner, C.D. (2003). Revision anterior cruciate ligament reconstruction. <i>Orthopedic clinics of north america</i> , Band 34, Auflage 1, Seite 79-98.
3.	Ambrock, M. (2013). Einfluss von BMP-7 auf Wachstum und Interaktion von Osteoblasten, Fibroblasten und Sehnen. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg.
4.	Andriacchi, T.P., Alexander, E.J., Toney, M.K., Dyrby, C., Sum, J. (1998). A point cluster method for in vivo motion analysis: applied to a study of knee kinematics. <i>Journal of biomechanical engineering</i> , Band 120, Auflage 6, Seite 743-749.
5.	Aoki, H., Fujii, M., Imamura, T., Yagi, K., Takehara, K., Kato, M., Miyazono, K. (2001). Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. <i>Journal of cell sciences</i> , Band 114, Auflage 8, Seite 1483-1489.
6.	Apostolakos, J., Durant, T.J., Dwyer, C.R., Russell, R.P., Weinreb, J.H., Alaei, F., Beitzel, K., McCarthy, M.B., Cote, M.P., Mazzocca, A.D. (2014). The enthesis: a review of the tendon-to-bone insertion. <i>Muscle, ligaments and tendons journal</i> , Band 4, Auflage 3, Seite 333-342.
7.	Arendt, E., Dick, R. (1995). Knee injury patterns among men and women in collegiate basketball and soccer. NCAA data and review of literature. <i>American journal of sports medicine</i> , Band 23, Auflage 6, Seite 694-701.
8.	Armbrrecht, M. (2013). Detektion von Kontaminationen in DNA- und Protein-Proben durch photometrische Messungen. <i>Eppendorf applikation notes</i> , Band 279.
9.	Arsenijevic, T., Grégoire, F., Delforge, V., Delporte, C., Perret, J. (2012). Murine 3T3-L1 adipocyte cell differentiation model: validated reference genes for qPCR gene expression analysis. <i>PLoS one</i> , Band 7, Auflage 5, e37517.
10.	Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spaniel-Borowski, K., Wolff, W., Wurzing, L.J., Zilch, H.-G. (2010). <i>Duale Reihe: Anatomie</i> . 2. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, New York.
11.	Bahr, R., Krosshaug, T. (2005). Understanding injury mechanism: A key component of preventing injuries in sports. <i>British journal of sports medicine</i> , Band 39, Auflage 6, Seite 324-329.

Nummer	Literaturquelle
12.	Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. Nature, Band 226, Ausgabe 5252, Seite 1209-1211.
13.	Bauer, G., Buchner, Schmitt, H., Engelhardt, M., Krüger-Franke, M., Benedetto, K.P., Mayr, H., Ellermann, E., Miltner, O. (2010). Vorderes Kreuzband – Kapitel: OP-Indikation. GOTS-Expertenmeeting: Vorderes Kreuzband. Gesellschaft für Orthopädisch-Traumalogische Sportmedizin, Seite 53-58.
14.	Baumgartl, F. (1964). Das Kniegelenk, 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
15.	Benecke, P. (2015). Funktionalität der vorderen Kreuzbandplastik in Doppelbündeltechnik nach zwei Jahren – Ein Vergleich zwischen Einzelbündeltechnik und Doppelbündeltechnik unter Berücksichtigung der Rotationsstabilität. Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
16.	Benjamin, M., Evans, E.J., Copp, L. (1986). The histology of tendon attachments to bone in man. Journal of anatomy, Band 149, Seite 89-100.
17.	Benjaminse, A., Gokeler, A., van der Schans, C.P. (2006). Clinical diagnosis of an anterior cruciate ligament rupture: a meta-analysis. Journal of orthopaedic and sports physical therapy, Band 36, Volume 5, Seite 267-288.
18.	Bente, D.A. (2003). Evaluierung konventioneller und real-time RT-PCR-Protokoll für die spezifische Diagnose des Virus der klassischen Schweinepest. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
19.	Beynon, B.D., Shultz, S.J. (2008). Anatomic alignment, menstrual cycle phase, and the risk of cruciate ligament injury. Journal of athletic training, Band 43, Auflage 5, Seite 541-542.
20.	Biau, D.J., Tournoux, C., Katsahian, S., Schranz, P., Nizard, R. (2007). ACL reconstruction: a meta-analysis of functional scores. Clinical orthopaedics and related research, Band 458, Seite 180-187.
21.	Boden, B., Dean, G., Feagin, J.A. Jr., Garrett, W.E. Jr. (2000). Mechanisms of anterior cruciate ligament injury. Orthopaedics, Band 23, Auflage 6, Seite 573-578.
22.	Brindl, T., Nyland, J., Johnson, D.L. (2001). The meniscus: review of basic principles with application to surgery and rehabilitation. Journal of Athletic Training, Band 36, Auflage 2, Seite 160-169.
23.	Buchner, M., Bauer, G., Benedetto, K.-P., Dann, K., Ellermann, A., Mayr, H., Schmitt, H. (2010). Vorderes Kreuzband – Kapitel: Transplantatwahl. GOTS-Expertenmeeting: Vorderes Kreuzband. Gesellschaft für Orthopädisch-Traumalogische Sportmedizin, Seite 59-65.
24.	Burks, R.T., Crim, J., Fink, B.P., Boylan, D.N., Greis, P.E. (2005). The effects of semitendinosus and gracilis harvest in anterior cruciate ligament reconstruction. Arthroscopy, Band 21, Auflage 10, Seite 1177-1185.
25.	Cao, X., Chen, D. (2005). The BMP signaling and in vivo bone formation. Gene, Band 357, Auflage 1, Seite 1-8.
26.	Carbonare, D.L., Innamorati, G., Valenti, M.T. (2012). Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. Stem cell reviews, Band 8, Auflage 3, Seite 891-897.
27.	Carrel, A. (1912). On the permanent life of tissues outside of the organism. Journal of experimental medicine, Band 15, Ausgabe 5, Seite 516-528.

Nummer	Literaturquelle
28.	Carrel, A. (1913). Contributions to the study of the mechanism of the growth of connective tissue. Journal of experimental medicine, Band 18, Auflage 3, Seite 287-298.
29.	Carson, E.W., Anisko, E.M., Restrepo, C., Panariello, R.A., O'Brien, S.J., Warren, R.F. (2004). Revision anterior cruciate ligament reconstruction: etiology of failures and clinical results. Journal of knee surgery, Band 17, Auflage 3, Seite 127-132.
30.	Chang, H., Brown, C.W., Matzuk, M.M. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. Endocrine reviews, Band 23, Auflage 6, Seite 787-823.
31.	Cheifetz, S., Li, I.W., McCulloch, C.A., Sampath, K., Sodek, J. (1996). Influence of osteogenic protein-1 (OP-1; BMP-7) and transforming growth factor-beta 1 on bone formation in vitro. Connective tissue research, Band 35, Auflage 1-4, Seite 71-78.
32.	Chen, D., Zhao, M., Mundy, G.R. (2004). Bone morphogenetic proteins. Growth factors, Band 24, Auflage 4, Seite 233-241.
33.	Chen, C.H., Chuang, T.Y., Wang, K.C., Chen, W.J., Shih, C.H. (2006). Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with quadriceps tendon autograft: clinical outcome in 4-7 years. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, Band 14, Auflage 11, Seite 1077-1085.
34.	Chen, C. (2009). Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. Sports Medicine, arthroscopy, rehabilitation, therapy & technology, Band 1, Auflage 1, Seite 21-28.
35.	Cho, Y., Kim, B., Bae, H., Kim, W., Baek, J., Woo, K., Lee, G., Seol, Y., Lee, Y., Ku, Y., Rhyu, I., Ryoo, H. (2017). Journal of dental research, Band 96, Auflage 5, Seite 555-561.
36.	Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical biochemistry, Band 162, Auflage 1, Seite 156-159.
37.	Cohen, M.M. Jr. (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. American journal of medical genetics, part A, Band 140, Auflage 23, Seite 2646-2706.
38.	Colby, S., Francisco, A., Yu, B., Kirkendall, D., Finch, M., Garrett, W. Jr. (2000). Electromyographic and kinematic analysis of cutting maneuvers – Implications for anterior cruciate ligament injury. American journal of sports medicine, Band 28, Auflage 2, Seite 234-240.
39.	Cooper, D.N., Chen, J.M. (2012). Mutations in human genetic diseases. 1. Auflage, InTech Online-Verlag.
40.	Crick, F. (1958). On protein synthesis. Symposia of the society for experimental biology, Band 12, Seite 138-163.
41.	Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. Nature, Band 227, Ausgabe 5258, Seite 561-563.
42.	Crönlein, M. (2012). In vitro Zellkultur-Studie über die Signifikanz von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) im Prozess der Knochen-Sehnen-Integration. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg.
43.	Chubinskaya, S., Kuettner, K.E., (2003). Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. The International Journal of biochemistry and cell biology, Band 35, Auflage 9, Seite 1323-1340.
44.	Chubinskaya, S., Hurtig, M., Rueger, D.C. (2007). OP-1 / BMP-7 in cartilage repair. International orthopaedics, Band 31, Auflage 6, Seite 773-781.

Nummer	Literaturquelle
45.	DeMorat, G., Weinhold, P., Blackburn, T., Chudik, S., Garrett, W. (2004). Aggressive quadriceps loading can induce noncontact anterior cruciate ligament injury. American journal of sports medicine, Band 32, Auflage 2, Seite 477-483.
46.	Desjardins, P., Conklin, D.S. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. Journal of visualized experiments, Band 45, Seite 2565.
47.	Dirckx, N., Van Hul, M., Maes, C. (2013). Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. Birth defects research – part C embryo today reviews, Band 99, Auflage 3, Seite 170-191.
48.	Diermann, N., Schumacher, T., Schanz, S., Raschke, M.J., Petersen, W., Zantop, T. (2009). Rotational instability of the knee: internal tibial rotation under a simulated pivot shift test. Archives of orthopaedic and traumatic surgery, Band 129, Auflage 3, Seite 353-358.
49.	Dilger, T. (2012). Biomechanische Untersuchungen zur Evaluation der Kinematik und Stabilität einer bikompartimentellen, kreuzbanderhaltenden Kniegelenks-Endoprothese. Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen.
50.	Duan, P., Bonewald, L.F. (2016). The role of the wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. International journal of biochemistry and cell biology. Band 77, Part A, Seite 23-29.
51.	Ducy, P., Karsenty, G. (2000). The family of bone morphogenetic proteins. Kidney international, Band 57, Auflage 6, Seite 2207-2214.
52.	Dudley, A., Lyons, K.M., Robertson, E.J. (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. Genes and development, Band 9, Auflage 22, Seite 2795-2807.
53.	Ehrig, R.M., Taylor, W.R., Duda, G.N., Heller, M.O. (2007). A survey of formal methods for determining functional joint axes. Journal of biomechanics, Band 40, Auflage 10, Seite 2150-2157.
54.	Ekdahl, M., Wang, J., Ronga, M., Fu, F. (2008). Graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, Band 16, Auflage 10, Seite 935-947.
55.	Engebretsen, L., Lewis, J.L. (1996). Graft selection and biomechanical considerations in ACL reconstruction (isometry, stress, preload). Sport medicine and arthroscopy review, Band 4, Auflage 3, Seite 336-341.
56.	Engebretsen, L., Risberg, M.A., Robertson, B., Ludvigsen, T.C., Johansen, S. (2009). Outcome after knee dislocations: a 2-9 years follow-up of 85 consecutive patients. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, Band 17, Auflage 9, Seite 1013-1026.
57.	Erlich, H.A. (1989). PCR technology: principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, Amsterdam, Niederlande.
58.	Ettlinger, C.F., Johnson, R.J., Shealy, J.E. (1995). A method to help reduce the risk of serious knee sprains incurred in alpine skiing. American journal of sports medicine, Band 23, Auflage 5, Seite 531-537.

Nummer	Literaturquelle
59.	Faber, K.J., Dill, J.R., Amendola, A., Thain, L., Spouge, A., Fowler, P.J. (1999). Occult osteochondral lesions after anterior cruciate ligament rupture: six-year magnetic resonance imaging follow-up study. American journal of sports medicine (1999), Band 27, Auflage 4, Seite 489-494.
60.	Fagelman, M., Freedman, K.B. (2005). Revision reconstruction of the anterior cruciate ligament: evaluation and management. American journal of orthopedics, Band 34, Auflage 7, Seite 319-328.
61.	Fathima, Harish, V. (2015). Osteostimulatory effect of bone grafts on fibroblast cultures. Journal of natural science, biology and medicine, Band 6, Auflage 2, Seite 291-294.
62.	Fick, R. (1904). Handbuch der Anatomie und Mechanik der Gelenke unter Berücksichtigung der bewegenden Muskeln – 1. Band: Anatomie der Gelenke. Fischer-Verlag, Jena.
63.	Fick, R. (1911). Handbuch der Anatomie und Mechanik der Gelenke unter Berücksichtigung der bewegenden Muskeln – 3. Band: Spezielle Gelenk- und Muskelmechanik. Fischer-Verlag, Jena.
64.	Fink, C., Hoser, C., Hackl, W., Navarro, R.A., Benedetto, K.P. (2001). Long-term outcome of operative or nonoperative treatment of anterior cruciate ligament rupture: is sports activity a determining variable?. International journal of sports medicine, Band 22, Auflage 4, Seite 304-309.
65.	Fitzgerald, G.K., Axe, M.J., Synder-Mackler, L. (2000). A decision-making scheme for returning patients to high-level activity with nonoperative treatment after anterior cruciate ligament rupture. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, Band 8, Auflage 2, Seite 76-82.
66.	Freiling, D., Galla, M., Lobenhoffer, P. (2006). Die Behandlung von Bewegungsstörungen nach arthroskopischen Eingriffen am Kniegelenk. Arthroscopie, Band 19, Auflage 2, Seite 142-150.
67.	Fu, F.H., Bennett, C.H., Lattermann, C., Ma, C.B. (1999). Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. Part 1: Biology and biomechanics of reconstruction. American journal of sports medicine, Band 27, Auflage 6, Seite 821-830.
68.	Fu, F.H., van Eck, C.F., Tashman, S., Irrgang, J.J., Moreland, M.S. (2014). Anatomic anterior cruciate ligament reconstruction: a changing paradigm. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, Band 23, Auflage 3, Seite 640-648.
69.	Fukubayashi, T., Torzilli, P.A., Sherman, M.F., Warren, R.F. (1982). An in vitro biomechanical evaluation of anterior-posterior motion of the knee. Tibial displacement, rotation, and torque. Journal of bone and joint surgery, Band 64, Auflage 2, Seite 258-264.
70.	Gautschi, O.P., Frey, S.P., Zellweger, R. (2007). Bone morphogenetic proteins in clinical applications. ANZ journal of surgery, Band 77, Auflage 8, Seite 626-631.
71.	Geib, T.M., Shelton, W.R., Phelps, R.A., Clark, L. (2009). Anterior cruciate ligament reconstruction using quadriceps tendon autograft: intermediate-term outcome. Arthroscopy, Band 25, Auflage 12, Seite 1408-1414.
72.	Girgis, F.G., Marshall, J.L., Monejam, A.R.S. (1975). The cruciate ligaments of the knee joint – anatomical, functional and experimental analysis. Clinical orthopaedics and related research, Band 106, Seite 216-231.
73.	Granjeiro, J.M., Oliveira, R.C., Bustos-Valenzuela, J.C., Sogayar, M.C., Taga, R. (2005). Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. Brazilian journal of medical and biological research, Band 38, Auflage 8, Seite 1463-1473.

Nummer	Literaturquelle
74.	Griffin, L.Y., Agel, J., Albohm, M.J., Arendt, E.A., Dick, R.W., Garrett, W.E., Garrick, J.G., Hewett, T.E., Huston, L., Ireland, M.L., Johnson, R.J., Kibler, W.B., Lephart, S., Lewis, J.L., Lindenfeld, T.N., Mandelbaum, B.R., Marchak, P., Teitz, C.C., Wojtys, E.M. (2000). Noncontact anterior cruciate ligament injuries: risk factors and prevention strategies. Journal of the american Academy of orthopaedic surgeons, Band 8, Auflage 3, Seite 141–150.
75.	Griffith, D., Keck, P., Sampath, T., Rueger, D., Carlson, W. (1996). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america, Band 93, Auflage 2, Seite 878-883.
76.	Grifka, J., Krämer, J. (2013). Orthopädie und Unfallchirurgie. 9. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
77.	Gokeler, A., Zantop, T., Jöllenbeck, T. (2010). Vorderes Kreuzband – Kapitel: Epidemiologie. GOTS-Expertenmeeting: Vorderes Kreuzband. Gesellschaft für Orthopädisch-Traumalogische Sportmedizin, Seite 3-13.
78.	Gorschewsky, O., Klakow, A., Pütz, A., Mahn, H., Neumann, W. (2007). Clinical comparison of the autologous quadriceps tendon (BQT) and the autologous patella tendon (BPTB) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, Band 15, Auflage 11, Seite 1284-1292.
79.	Harman, M.K., Markovich, G.D., Banks, S.A., Hodge, W.A. (1998). Wear pattern on tibial plateaus from varus and valgus osteoarthritic knees. Clinical orthopaedics and related research, Band 352, Seite 149-158.
80.	Harner, C.D., Irrgang, J.J., Dearwater, S., Fu, F.H. (1992). Loss of motion after anterior cruciate ligament reconstruction. American journal of sports medicine, Band 20, Auflage 5, Seite 499-506.
81.	Hassan, M.Q., Gordon, J.A., Beloti, M.M., Croce, C.M., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., Lian, J.B. (2010). A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, Band 107, Auflage 46, Seite 19879-19884.
82.	Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Experimental cell research, Band 37, Seite 614-636.
83.	Heinlein, B., Graichen, F., Bender, A., Rohlmann, A., Bergmann, G. (2007). Design, calibration and pre-clinical testing of an instrumented tibial tray. Journal of biomechanics, Band 40, Beilage 1, Seite 4-10.
84.	Heller, M.O., Bergmann, G., Deuretzbacher, G., Dürselen, L., Pohl, M., Claes, L., Haas, N.P., Duda, G.N. (2001). Musculo-skeletal loading conditions at the hip during walking and stair climbing. Journal of biomechanics, Band 34, Auflage 7, Seite 883-893.
85.	Heller, M.O., Taylor, W.R., Perka, C., Duda, G.N. (2003). The influence of alignment on the musculo-skeletal loading conditions at the knee. Langenbeck's archives of surgery, Band 388, Auflage 5, Seite 291-297.

Nummer	Literaturquelle
86.	Heller, M.O., König, C., Graichen, H., Hinterwimmer, S., Ehrig, R.M., Duda, G.N., Taylor, W.R. (2007). A new model to predict in vivo human knee kinematics under physiological-like muscle activation. <i>Journal of biomechanics</i> , Band 40, Beilage 1, Seite 45-53.
87.	Heller, M.O., Matziolis, G., König, C. (2007). Muskuloskelettale Biomechanik des Kniegelenkes. Grundlagen für die präoperative Planung von Umstellung und Gelenkersatz. <i>Der Orthopädie</i> , Band 36, Ausgabe 7, Seite 628-634.
88.	Hewett, T.E., Myer, G.D., Ford, K.R. (2001). Prevention of anterior cruciate ligament injuries. <i>Current women's health reports</i> , Band 1, Auflage 3, Seite 218-224.
89.	Hewett, T.E., Myer, G.D., Ford, K.R., Heidt, R.S. Jr., Colosimo, A.J., McLean, S.G., van den Bogert, A.J., Paterno, M.V., Succop, P. (2005). Biomechanical measures of neuromuscular control and valgus loading of the knee predict anterior cruciate ligament injury risk in female athletes: a prospective study. <i>American journal of sports medicine</i> , Band 33, Auflage 4, Seite 492-501.
90.	Hewett, T.E., Johnson, D.L. (2010). ACL prevention programs: fact or fiction?. <i>Orthopaedics</i> , Band 33, Auflage 1, Seite 36-39.
91.	Hill, P.F., Vedi, V., Williams, A., Iwaki, H., Pinskerova, V., Freeman, M.A. (2000). Tibiofemoral movement 2: the loaded and unloaded living knee studied by MRI. <i>Journal of bone and joint surgery</i> , Band 82, Auflage 8, Seite 1196-1208.
92.	Holm, I., Oiestad, B.E., Risberg, M.A., Aune, A.K. (2010). No difference in knee function or prevalence of osteoarthritis after reconstruction of the anterior cruciate ligament with 4-strand hamstring autograft versus patellar tendon-bone autograft. <i>American journal of sports medicine</i> , Band 38, Auflage 3, Seite 448-454.
93.	Huang, W., Yang, S., Shao, J., Yi-Ping, L. (2007). Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. <i>Frontiers in biosciences</i> , Band 1, Auflage 12, Seite 3068-3092.
94.	Huston, L.J., Greenfield, M.L., Wojtys, E.M. (2000). Anterior cruciate ligament injuries in the female athlete. Potential risk factors. <i>Clinical orthopaedics and related research</i> , Band 372, Seite 50-63.
95.	Hsieh, Y.F., Draganich, L.F., Ho, S.H., Reider, B. (2002). The effects of removal and reconstruction of the anterior cruciate ligament on the contact characteristics of the patellofemoral joint. <i>American journal of sports medicine</i> , Band 30, Auflage 1, Seite 121-127.
96.	Hyung, K.K., Jun, S.L., Ji, H.K., Jong, K.S., Kyung S.P., Myung H.J., Taek, R.Y. (2017). Bone-forming peptide-2 derived from BMP-7 enhances osteoblast differentiation from multipotent bone marrow stromal cells and bone formation. <i>Experimental & Molecular Medicine</i> , Band 49, Auflage 5, Seite 328-330.
97.	Im, H.J., Pacione, C., Chubinskaya, S., van Wijnen, A.J., Sun, Y., Loeser, R.F. (2003). Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on fibronectin fragment- and interleukin-1 β -stimulated matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. <i>Journal of biological chemistry</i> , Band 278, Auflage 28, Seite 25386-25394.
98.	Irrgang, J.J., Ho, H., Harner, C.D., Fu, F.H. (1998). Use of the International Knee Documentation Committee guidelines to assess outcome following anterior cruciate ligament reconstruction. <i>Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy</i> , Band 6, Auflage 2, Seite 107-114.

Nummer	Literaturquelle
99.	Ishiguro, T., Saitoh, J., Yawata, H., Yamagishi, H., Iwasaki, S., Mitoma, Y. (1995). Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalator. <i>Analytical biochemistry</i> , Band 229, Auflage 2, Seite 207-213.
100.	Israel, D.I., Nove, J., Kerns, K.M., Kaufman, R.J., Rosen, V., Cox, K.A., Wozney, J.M. (1996). Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. <i>Growth factors</i> , Band 3, Auflage 3-4, Seite 291-300.
101.	Iwaki, H., Pinskerova, V., Freeman, M.A. (2000). Tibiofemoral movement 1: the shapes and relative movements of the femur and tibia in the unloaded cadaver knee. <i>Journal of bone and joint surgery</i> , Band 82, Auflage 8, Seite 1189-1195.
102.	Jagodzinski, M., Friederich, N., Müller, W. (2015). <i>Das Knie: Form, Funktion und ligamentäre Wiederherstellungschirurgie</i> . 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, New York.
103.	Jakob, R.P., Stäubli, H.U. (1990). <i>Kniegelenk und Kreuzbänder: Anatomie, Biomechanik, Klinik, Rekonstruktion, Komplikation, Rehabilitation</i> . 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, New York.
104.	Jelic, M., Pecina, M., Haspl, M., Kos, J., Taylor, K., Maticic, D., McCartney, J., Yin, S., Rueger, D., Vukicevic, S. (2001). Regeneration of articular cartilage chondral defects by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in sheep. <i>Growth factors</i> , Band 19, Auflage 2, Seite 101-113.
105.	Johnson, D.L., Fu, F.H. (1995). Anterior cruciate ligament reconstruction: why do failures occur?. <i>Instructional course lectures</i> , Band 44, Seite 391-406.
106.	Jomha, N.M., Borton, D.C., Clingeleffer, A.J., Pinczewski, L.A. (1999). Long-term osteoarthritic changes in anterior cruciate ligament reconstructed knees. <i>Clinical orthopaedics and related research</i> , Band 358, Seite 188-193.
107.	Jonason, J.H., Xiao, G., Zhang, M., Xing, L., Chen, D. (2009). Post-translational regulation of Runx2 in bone and cartilage. <i>Journal of dental research</i> , Band 88, Auflage 8, Seite 693-703.
108.	Jun, S.L., Mi, E.K., Jong, K.S., Ju, Y.K., Taek, R.Y., Yong, D.P., Hyung, K.K. (2018). Bone-forming peptide-3 induces osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells via regulation of the ERK1/2 and Smad 1/5/8 pathways. <i>Stem Cell Research</i> , Band 26, Januar-Auflage, Seite 28-35.
109.	Katagiri, T., Takahashi, N. (2002). Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. <i>Oral diseases</i> , Band 8, Auflage 3, Seite 147-159.
110.	Kawase, T., Sato, S., Miake, K., Saito, S. (1998). Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. <i>Advances in dental research</i> , Band 2, Auflage 2, Seite 234-239.
111.	Kellis, E. (2001). Tibiofemoral joint forces during maximal isokinetic eccentric and concentric efforts of the knee flexors. <i>Clinical Biomechanics</i> , Band 16, Auflage 3, Seite 229-236.
112.	Khurana, J.S. (2016). <i>Bone Pathology</i> . 2. Auflage. Humana Press.
113.	Kim, Y., Kang, B.J., Kim, W.H., Yun, H.S., Kweon, O.K. (2018). Evaluation of mesenchymal stem cell sheets overexpressing BMP-7 in canine critical-sized bone defects. <i>International journal of molecular sciences</i> , Band 19, Auflage 7, Artikel E2073.
114.	Kirchhoff, C. (2014). <i>Die Lokalisation von BMP-2, BMP-7 und deren Rezeptoren im Kniegelenk bei umschriebenem Knorpelschaden</i> . Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg.
115.	Koch, J.C. (1917). The law of bone architecture. <i>The american journal of anatomy</i> . Band 21, Auflage 2, Seite 177-298.

Nummer	Literaturquelle
116.	Kocher, M.S., Steadman, J.R., Briggs, K., Zuratkowski, D., Sterett, W.I., Hawkins, R.J. (2002). Determinants of patient satisfaction with outcome after anterior cruciate ligament reconstruction. Journal of bone and joint surgery, Band 84, Auflage A(9), Seite 1560-1572.
117.	Kohn, D. (2000). Das Knie – Expertise Orthopädie und Unfallchirurgie. 1. Auflage. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York.
118.	Komori, T. (2010). Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. Advances in experimental medicine and biology, Band 658, Seite 43-49.
119.	Kosmistek, R.D., Kane, T.R., Mahfouz, M., Ochoa, J.A., Dennis, D.A. (2005). Knee mechanics: a review of past and present techniques to determine in vivo loads. Journal of biomechanics, Band 38, Auflage 2, Seite 215-228.
120.	Krosshauq, T., Slauterbeck, J.R., Engebretsen, L., Bahr, R. (2007). Biochemical analysis of anterior cruciate ligament injury mechanisms: the-dimensional motion reconstruction from video sequences. Scandinavian journal of medicine and science in sports, Band 17, Auflage 5, Seite 508-519.
121.	Krudwig, W.K. (2000). Situation der Arthroskopie in Deutschland. Arthroskopie, Band 13, Auflage 4, Seite 191-193.
122.	Kummer, B., Yamamoto, M. (1988). Morphologie und Funktion des Kreuzbandapparats des Kniegelenks. Arthroskopie, Band 1, Auflage 1, Seite 2-10.
123.	Kummer, B. (2005). Biomechanik: Form und Funktion des Bewegungsapparates. 1. Auflage. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
124.	Lang, J., Wachsmuth, W. (1972). Praktische Anatomie: Bein und Statik. 2. Auflage, 1. Band, 4. Teil. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
125.	Lautamies, R., Harilainen, A., Kettunen, J., Sandelin, J., Kujala, U. (2008). Isokinetic quadriceps and hamstring muscle strength and knee function 5 years after anterior cruciate ligament reconstruction: comparison between bone-patellar tendon-bone and hamstring tendon autografts. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, Band 16, Auflage 11, Seite 1009-1016.
126.	Lavery, K., Hawley, S., Swain, P., Rooney, R., Falb, D., Alaoui-Ismaili, M.H. (2009). New insights into BMP-7 mediated osteoblastic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. Bone, Band 45, Auflage 1, Seite 27-41.
127.	Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Choi, J.Y., Ryoo, H.M., Bae, S.C. (2000). Runx2 is a common target of transforming growth factor beta 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. Molecular and cellular biology, Band 20, Auflage 23, Seite 8783-8792.
128.	Lee, S., Seong, S.C., Jo, H., Park, Y.K., Lee, M.C. (2004). Outcome of anterior cruciate ligament reconstruction using quadriceps tendon autograft. Arthroscopy, Band 20, Auflage 8, Seite 795-802.
129.	Lelli, A., Di Turi, R.P., Spenciner, D.B., Domini, M. (2016). The lever sign: a new clinical test for the diagnosis of anterior cruciate ligament rupture. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, Band 24, Auflage 9, Seite 2794-2797.

Nummer	Literaturquelle
130.	Lemaire, M. (1967). Rupture ancienne du ligament croisé antérieur du genou; fréquence, clinique, traitement. Journal de chirurgie, Band 93, Seite 311-20.
131.	Levy, A.S., Meier, S.W. (2003). Approach to cartilage injury in the anterior cruciate ligament-deficient knee. Orthopedic clinics of north america, Band 34, Auflage 1, Seite 149-157.
132.	Liden, M., Ejerhed, L., Sernert, N., Laxdal, G., Kartus, J. (2007). Patellar tendon or semitendinosus tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction. American journal of sports medicine, Band 35, Auflage 5, Seite 740-748.
133.	Lipke, J.M., Janecki, C.J., Nelson, C. (1981). The role of incompetence of the anterior cruciate and lateral ligaments in anterolateral and anteromedial instability. A biomechanical study of cadaver knee. Journal of bone and joint surgery, Band 63, Auflage 3, Seite 954-960.
134.	Loeser, R.F., Pacione, C.A., Chubinskaya, S. (2003). The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Arthritis and rheumatism, Band 48, Auflage 8, Seite 2188-2196.
135.	Lohmander, L.S., Englund, P.M., Dahl, L.L., Roos, E.M. (2007). Long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: osteoarthritis. American journal of sports medicine, Band 35, Auflage 10, Seite 1756-1769.
136.	Lorenz, F. (2006). Ein bisschen Unsterblichkeit – über die Zellen von Henrietta Lacks. Die Zeit, Band 52.
137.	Luu, H.H., Song, W.X., Luo, X., Manning, D., Luo, J., Deng, Z.L., Sharff, K.A., Montag, A.G., Haydon, R.C., He, T.C. (2007). Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Journal of orthopaedic research, Band 25, Auflage 5, Seite 665-677.
138.	Macías-Silva, M., Hoodless, P.A., Tang, S.J., Buchwald, M., Wrana, J.L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. Journal of biological chemistry, Band 273, Auflage 40, Seite 25628-25636.
139.	Majewski, M., Susanne, H., Klaus, S. (2006). Epidemiology of athletic knee injuries: A 10-year study. Knee, Band 13, Auflage 3, Seite 184-188.
140.	Marsell, R., Einhorn, T.A. (2009). The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. Injury, Band 40, Beilage 3, Seite 4-7.
141.	Massagué, J., Chen, Y. (2000). Controlling TGF-beta signaling. Genes & development, Band 14, Auflage 6, Seite 627-644.
142.	Massey, P.A., Harris, J.D., Winston, L.A., Lintner, D.M., Delgado, D.A., McCulloch, P.C. (2017). Critical analysis of the lever test for diagnosis of anterior cruciate ligament insufficiency. Arthroscopy, Band 33, Auflage 8, Seite 1560-1566.
143.	McConkey, J.P. (1986). Anterior cruciate ligament rupture in skiing. A new mechanism of injury. American journal of sports medicine, Band 14, Auflage 2, Seite 160-164.
144.	McLean, S.G., Andrish, J.T., van der Bogert, A.J. (2005). Aggressive quadriceps loading can induce non-contact anterior cruciate ligament injury. American journal of sports medicine, Band 33, Auflage 7, Seite 1106-1107.

Nummer	Literaturquelle
145.	McNair, P.J., Marshall, R.N., Matheson, J.A. (1990). Important features associated with acute anterior cruciate ligament injury. New zealand medical journal, Band 103, Auflage 901, Seite 537-539.
146.	Menetrey, J., Duthon, V., Laumonier, T., Fritschy, D. (2008). Biological failure of the anterior cruciate ligament graft. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, Band 16, Auflage 3, Seite 224-231.
147.	Messina, D.F., Farney, W.C., DeLee, J.C. (1999). The incidence of injury in Texas high school basketball. A prospective study among male and female athletes. American journal of sports medicine, Band 27, Auflage 3, Seite 294-299.
148.	Meyers, M.H., McKeever, K.M. (1970). Fracture of the intercondylar eminence of the tibia. Journal of bone and joint surgery, Band 52, Auflage 8, Seite 1677.
149.	Mihelic, R., Pecina, M., Jelic, M., Zoricic, S., Kusec, V., Simic, P., Bobinac, D., Lah, B., Legovic, D., Vukicevic, S. (2004). Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) promotes tendon graft integration in anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. American journal of sports medicine, Band 32, Auflage 7, Seite 1619-1625.
150.	Miyazono, K., Kamiya, Y., Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. Journal of biochemistry, Band 147, Auflage 1, Seite 35-51.
151.	Moore, T.M., Patzakis, M.J., Harvey, J.P. (1987). Tibial plateau fractures: definition, demographics, treatment rationale, and long-term results of closed traction management or operative reduction. Journal of orthopaedic trauma, Band 1, Auflage 2, Seite 97-119.
152.	Moustakas, A., Heldin, C.-H. (2009). The regulation of TGF- β signal transduction. Development, Band 136, Seite 3699-3714.
153.	Mülhardt, C. (2009). Der Experimentator – Molekularbiologie / Genomics. 6. Auflage. Spektrum – Akademischer Verlag, Berlin (2009).
154.	Mullis, K.B., Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, Volume 239, Auflage 4839, Seite 487-491.
155.	Myklebust, G., Maehlum, S., Holm, I., Bahr, R. (1998). A prospective cohort study of anterior cruciate ligament injuries in elite Norwegian team handball. Scandinavian journal of medicine and science in sports, Band 8, Auflage 3, Seite 149-153.
156.	Nagura, T., Dyrby, C.O., Alexander, E.J., Andriacchi, T.P. (2002). Mechanical loads at the knee joint during deep flexion. Journal of orthopaedic research, Band 20, Auflage 4, Seite 881-886.
157.	Nielsen, S., Ovesen, J., Rasmussen, O. (1984). The anterior cruciate ligament of the knee: an experimental study of its importance in the rotatory knee instability. Archives of orthopaedic and traumatic surgery, Band 103, Auflage 3, Seite 170-174.
158.	Nishida, Y., Knudson, C.B., Eger, W., Kuettner, K.E., Knudson, W. (2000). Osteogenic protein 1 stimulates cell-associated matrix assembly by normal human articular chondrocytes: up-regulation of hyaluronan synthase, CD44, and aggrecan. Arthritis and rheumatism. Band 43, Auflage 1, Seite 206-214.

Nummer	Literaturquelle
159.	Oiestad, B.E., Engebretsen, L., Storheim, K., Risberg, M.A. (2009). Knee osteoarthritis after anterior cruciate ligament injury: a systematic review. American journal of sports medicine, Band 37, Auflage 7, Seite 1434-1443.
160.	Olsen, O.-E., Myklebust, G., Engebretsen, L., Bahr, R. (2004). Injury mechanisms for anterior cruciate ligament injuries in team handball: a systematic video analysis. American journal of sports medicine, Band 32, Auflage 4, Seite 1002-1012.
161.	Papageorgiou, C.D., Ma, C.B., Abramowitch, S.D., Clineff, T.D., Woo, S.L. (2001). A multidisciplinary study of the healing of an intraarticular anterior cruciate ligament graft in a goat model. American journal of sports medicine, Band 29, Auflage 5, Seite 620-626.
162.	Park, M.J., Lee, M.C., Seong, S.C. (2001). A comparative study of the healing of tendon autograft and tendon-bone autograft using patellar tendon in rabbits. International orthopaedics, Band 25, Auflage 1, Seite 35-39.
163.	Pässler, J.M., Schippinger, G., Schweighofer, F., Fellingner, M., Seibert, F.J. (1995). Komplikationen bei 283 Kreuzbandoperationen mit freiem Patellarsehnentransplantat. Unfallchirurgie, Band 21, Auflage 5, Seite 240-246.
164.	Pässler, H.H. (2010). Anatomic anterior cruciate ligament reconstruction with hamstrings using press-fit fixation without hardware: operative technique and long-term results of a prospective and randomized study. Der Unfallchirurg, Band 113, Auflage 7, Seite 555-560.
165.	Pauwels, F. (1951). Über die Bedeutung der Bauprinzipien des Stütz- und Bewegungsapparates für die Beanspruchung des Röhrenknochens. Acta anatomica, Band 12, Seite 207-227.
166.	Persing, D.H. (1991). Polymerase chain reaction: trenches to benches. Journal of clinical microbiology, Band 29, Auflage 7, Seite 1281-1285.
167.	Petersen, W., Tillmann, B. (1995). Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. Acta orthopaedica scandinavica, Band 66, Auflage 4, Seite 308-312.
168.	Petersen, W., Tillmann, B. (2002). Anatomy and function of the anterior cruciate ligament. Der Orthopäde, Band 31, Auflage 8, Seite 710-718.
169.	Petersen, W., Zantop, T. (2009). Das vordere Kreuzband: Grundlagen und aktuelle Praxis der operativen Therapie. 1. Auflage. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.
170.	Pinczewski, L.A., Lyman, J., Salmon, L.J., Russell, V.J., Roe, J., Linklater, J. (2007). A 10-year comparison of anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring tendon and patellar tendon autograft: a controlled, prospective trial. American journal of sports medicine, Band 35, Auflage 4, Seite 564-574.
171.	Quatman, C.E., Hewett, T.E. (2009). The anterior cruciate ligament injury controversy: is „valgus collapse“ a sex-specific mechanism?. British journal of sports medicine, Band 43, Auflage 5, Seite 328-335.
172.	Race, A., Amis, A.A. (1994). The mechanical properties of the two bundles of the human posterior cruciate ligament. Journal of biomechanics, Band 27, Auflage 1, Seite 13-24.
173.	Rangger, C., Daniel, D.M., Stone, M.L., Kaufman, K. (1993). Diagnosis of an ACL disruption with KT-1000 arthrometer measurements. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, Band 1, Auflage 1, Seite 60-66.

Nummer	Literaturquelle
174.	Reddi, A.H. (1981). Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. Collagen and related research, Band 1, Auflage 2, Seite 209-226.
175.	Renström, P., Arms, S.W., Stanwyck, T.S., Johnson, R.J., Pope, M.H. (1986). Strain within the anterior cruciate ligament during hamstring and quadriceps activity. American journal of sports medicine, Band 14, Auflage 1, Seite 83-87.
176.	Renstrom, P., Ljungqvist, A., Arendt, E., Beynnon, B., Fukubayashi, T., Garrett, W., Georgoulis, T., Hewett, T.E., Johnson, R., Krosshaug, T., Mandelbaum, B., Micheli, L., Myklebust, G., Ross, E., Roos, H., Schamasch, P., Shultz, S., Werner, S., Wojtys, E., Engebretsen, L. (2008). Non-contact ACL injuries in female athletes: an International Olympic Committee current concepts statement. British journal of sports medicine, Band 42, Auflage 6, Seite 394-412.
177.	Rickard, D.J., Sullivan, T.A., Shenker, B.J., Leboy, P.S., Kazhdan, I. (1994). Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. Developmental biology, Band 161, Auflage 1, Seite 218-228.
178.	Rider, C.C., Mulloy, B. (2010). Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. Biochemical journal, Band 429, Auflage 1, Seite 1-12.
179.	Roux, W. (1883). Historical essays from Roux's archives of developmental biology. Landmarks in developmental biology 1883 – 1924, Band 195.
180.	Sanders, T.G., Miller, M.D. (2005). A systematic approach to magnetic resonance imaging interpretation of sports medicine injuries of the knee. American journal of sports medicine, Band 33, Auflage 1, Seite 131-148.
181.	Santavirta, S., Konttinen, Y.T., Lappalainen, R., Anttila, A., Goodman, S.B., Lind, M. (1998). Materials in total joint replacement. Current orthopaedics, Band 12, Auflage 1 Seite 51-57.
182.	Scapinelli, R. (1968). Studies on the vasculature of the human knee joint. Acta anatomica, Band 70, Auflage 3, Seite 305-331.
183.	Schenk, D. (noch nicht eingereicht). Untersuchung zur Interaktion und zum Einwachungsverhalten von Sehnen- und Knochenzellen unter BMP-2 – Stimulation im murinen Co-Kultur-Modell. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg, in Verfassung (noch nicht eingereicht).
184.	Scherner, O., Meurer, S.K., Tihaa, L., Gressner, A.M., Weiskirchen, R. (2007). Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. Journal of biological chemistry, Band 292, Auflage 19, Seite 13934-13943.
185.	Schettle, M. (2008). Vergleich der vorderen Kreuzbandplastik durch das mittlere Patellarsehnendrittel Allograft mit dem mittleren Patellarsehnendrittel Autograft bei Revisionseingriffen. Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
186.	Schieber, T.H., Korf, H.W. (2007). Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. 10. Auflage, Steinkopff-Verlag, Darmstadt.

Seite 202

Nummer	Literaturquelle
200.	Stephens, A.S., Stephens, S.R., Morrison, N.A. (2011). Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. BMC research botes, Band 4, Seite 410-412
201.	Strobel, M.J., Weiler, A., Schulz, M.S., Russe, K., Eichhorn, H.J. (2002). Fixed posterior subluxation in posterior cruciate ligament-deficient knees: diagnosis and treatment of a new clinical sign. American journal of sports medicine, Band 30, Auflage 1, Seite 32-38.
202.	Struwer, J., Croenlein, M., Ziring, E., Schwarting, T., Katz, M., Ruchholtz, S., Fragen, T.M. (2013). Effect of bone morphogenetic protein-2 on tendon-bone integration in an in vitro cell culture. Orthopedics, Band 36, Auflage 2, Seite 200-206.
203.	Tashiro, T., Kurosawa, H., Kawakami, A., Hikita, A., Fukui, N. (2003). Influence of medial hamstring tendon harvest on knee flexor strength after anterior cruciate ligament reconstruction. A detailed evaluation with comparison of single and double-tendon harvest. American journal of sports medicine, Band 31, Auflage 4, Seite 522-529.
204.	Taylor, W.R., Heller, M.O., Bergmann, G., Duda, G.N. (2004). Tibiofemoral loading during human gait and stair-climbing. Journal of orthopaedic research, Band 22, Auflage 3, Seite 625-632.
205.	Temin, H., Mizutani, S. (1970). RNA-dependent polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature, Band 226, Ausgabe 5252, Seite 1211-1213.
206.	Tuckermann, J.P., Pittois, K., Patridge, N.C., Merregaert, J., Angel, P. (2000). Collagenase-3 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (Itm2a) are marker genes of chondrogenetic / osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of Itm2a, alkaline phosphatase, MMP-13, and osteocalcin in the mouse. Journal of bone and mineral research, Band 15, Ausgabe 7, Seite 1257-1265.
207.	Urist, M.R. (1965). Bone: formation by autoinduction. Science, Band 150, Auflage 3698, Seite 893-899.
208.	Wagner, M., Schabus, R. (1982). Funktionelle Anatomie des Kniegelenks. 1. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
209.	Walker, N.J. (2002). A technique whose time has come. Science, Band 296, Auflage 5567, Seite 557-559.
210.	Wang, I.E., Shan, J., Choi, R., Oh, S., Kepler, C.K., Chen, F.H., Lu, H.H. (2007). Role of osteoblast-fibroblast interactions in the formation of the ligament-to-bone interface. Journal of orthopaedic research, Band 25, Auflage 12, Seite 1609-1620.
211.	Weig, T. (2002). Bewegungseinschränkung nach vorderer Kreuzbandrekonstruktion – Ursachenanalyse, Therapieergebnisse. Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
212.	Weinreb, M., Shinar, D., Rodan, G.A. (1990). Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. Journal of bone and mineral research, Band 5, Auflage 8, Seite 831-842.
213.	Wetz, H.H., Jacob, H.A. (2001). Funktionelle Anatomie und Kinematik des Femurotibialgelenks. Der Orthopäde, Band 30, Auflage 3, Seite 135-144.

Nummer	Literaturquelle
214.	Wetzler, M.J., Bartolozzi, A.R., Gillespie, M.J., Rubenstein, D.L., Ciccotti, M.G., Miller, L.S. (1996). Revision anterior ligament reconstruction. Operative techniques in orthopaedics, Band 6, Auflage 3, Seite 181-189.
215.	Wiberg, G. (1941). Roentgenographic and anatomic studies on the patellofemoral joint. Acta Orthopaedica Scandinavica, Band 12, Seite 319-409.
216.	Wilfinger, W.W., Mackey, K., Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. Biotechniques, Band 3, Ausgabe 3, Seite 474-476 und 478-481.
217.	Wilke, A., Rückert, C., Bartels, D., Dondrup, M., Goesmann, A., Hüser, A.T., Kespohl, S., Linke, B., Mahne, M., McHardy, A., Pühler, A., Meyer, F. (2003). Bioinformatics support für high-throughput proteomics. Journal of biotechnology, Band 106, Auflage 2-3, Seite 147-156.
218.	Wirth, C.J., Artmann, M. (1974). Verhalten der Roll-Gleit-Bewegung des belasteten Kniegelenkes bei Verlust und Ersatz des vorderen Kreuzbandes. Archiv für Orthopädische und Unfallchirurgie, Band 78, Auflage 4, Seite 356-361.
219.	Wirtz, D.C. (2011). AE-Manual der Endoprothetik – Knie. 1. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
220.	Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques, Band 22, Ausgabe 1 Seite 130-131 und 134-138.
221.	Wolff, J. (1982). Das Gesetz der Transformation der Knochen. Hirschwald-Verlag, Berlin.
222.	Woo, S.L., Hollis, J.M., Adams, D.J., Lyon, R.M., Takai, S. (1991). Tensile properties of the human femur-anterior cruciate ligament-tibia complex. The effects of specimen age and orientation. American journal of sports medicine, Band 19, Auflage 3, Seite 217-225.
223.	Woo, S.L., Debski, R.E., Withrow, J.D., Janshnek, M.A. (1999). Biomechanics of the knee ligaments. American journal of sports medicine, Band 27, Auflage 4, Seite 533-543.
224.	Wozney, J.M., Rosen, V. (1988). Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. Clinical orthopaedics and related research, Band 346, Seite 26-37.
225.	Wozney, J.M. (1989). Bone morphogenetic proteins. Progress in growth factor research, Band 1, Auflage 4, Seite 267-280.
226.	Wozney, J.M. (2002). Overview of bone morphogenetic proteins. Spine, Band 27, Auflage 16, Beilage 1, Seite 2-8.
227.	Wu, M., Chen, G., Li, Y.P. (2016). TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. Bone research, Band 4, Artikel 16009.
228.	Xia, Y., Yu, P.B., Sidis, Y., Beppu, H., Bloch, K.D., Schneyer, A.L., Lin, H.Y. (2007). Repulsive guidance molecule RGMA alters utilization of bone morphogenetic protein (BMP) type II receptors by BMP2 and BMP4. Journal of biological chemistry, Band 282, Auflage 25, Seite 18129-18140.
229.	Xue, Z., Niu, L.Y., An, G., Guo, Y.S., Lv, S.C., Ren, X.P. (2015). Expression of recombinant BMP-7 gene increased ossification activity in the rabbit bone mesenchymal stem cells. European review for medical and pharmacological sciences, Band 19, Auflage 16, Seite 3056-3062.

Nummer	Literaturquelle
230.	Yamamoto, K., Kishida, T., Sato, Y., Nishioka, K., Ejima, A., Fujiwara, H., Kubo, T., Yamamoto, T., Kanamura, N., Mazda, O. (2015). Direct conversion auf human fibroblasts into fuctional osteoblasts by defined factors. Proceedings of the national acadamy of sciences of the United States of America, Band 112, Auflage 19, Seite 6152-6157.
231.	Yamashita, H., ten Dijke, P., Hylebroeck, D., Sampath, T.K., Andries, M., Smith, J.C., Heldin, C.H., Miyazono, K. (1995). Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. Journal of cell biology, Band 130, Auflage 1, Seite 217-226.
232.	Yeh, L.C., Tsai, A.D., Lee, J.C. (2002). Osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) induces osteoblastic cell differentiation of the pluripotent mesenchymal cell line C2C12. Journal of cellular biochemistry, Band 87, Auflage 3, Seite 292-304.
233.	Yu, P.B., Beppu, H., Kawai, N., Li, E., Bloch, K.D. (2005). Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. Journal of biological chemistry, Band 280, Auflage 26, Seite 24443-50.
234.	Yu, B., Garrett, W.E. (2007). Mechanisms of non-contact ACL injuries. British journal of sports medicine, Band 41, Beilage 1, Seite 47-51.
235.	Zantop, T., Bauer, G., Buchner, M., Ellermann, A., Seil, R., Benedetto, K.-P. (2010). Vorderes Kreuzband – Kapitel: Diagnostik von VKB-Läsionen. GOTS-Expertenmeeting: Vorderes Kreuzband. Gesellschaft für Orthopädisch-Traumalogische Sportmedizin, Seite 33-51.
236.	Zebis, M.K., Bencke, J., Andersen, L.L., Alkjaer, T., Suetta, C., Mortensen, P., Kjaer, M., Aagard, P. (2010). Acute fatigue impairs neuromuscular activity of anterior cruciate ligament-agonist muscles in female team handball players. Scandinavian journal of medicine and science in sports, Band 21, Auflage 6, Seite 833-840.
237.	Zhang, H., Bradley, A. (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion /chorion and cardiac development. Development, Band 122, Auflage 10, Seite 2977-2986.

10. Anhang

10.1 Identifikations-Listen, Ergebnis-Listen und PCR-Schemata

10.1.1 ID-Liste für die Zwei-Kammer-Co-Kultivierung

Die nachfolgende Tabelle gibt die genaue Konzeption der Zwei-Kammer-Co-Kultivierungssysteme wieder. Dabei repräsentieren die Identifikations-Präfixe „S_“ die singuläre rhBMP7-Stimulation, wohingegen sich hinter den Identifikationen mit dem Beginn „M_“ die multiple rhBMP7-Stimulationsversuche verbergen.

Stimulations-Modus	Zeitpunkt	rhBMP7-Konzentration	Biologisches Replikat	Co-Kultivierungs-ID
Singuläre rhBMP7-Stimulation	3 Tage	0 ng/ml	1	S_01
			2	S_02
			3	S_03
		100 ng/ml	1	S_04
			2	S_05
			3	S_06
		250 ng/ml	1	S_07
			2	S_08
			3	S_09
		500 ng/ml	1	S_10
			2	S_11
			3	S_12
	7 Tage	0 ng/ml	1	S_13
			2	S_14
			3	S_15
		100 ng/ml	1	S_16
			2	S_17
			3	S_18
		250 ng/ml	1	S_19
			2	S_20
			3	S_21
		500 ng/ml	1	S_22
			2	S_23
			3	S_24
	10 Tage	0 ng/ml	1	S_25
			2	S_26
			3	S_27
		100 ng/ml	1	S_29

Stimulations-Modus	Zeitpunkt	rhBMP7-Konzentration	Biologisches Replikat	Co-Kultivierungs-ID
			2	S_29
			3	S_30
		250 ng/ml	1	S_31
			2	S_32
			3	S_33
		500 ng/ml	1	S_34
			2	S_35
			3	S_36
	0 Tage	0 ng/ml	1	S_39
			2	S_40
			3	S_41
Multiple rhBMP7-Stimulation	3 Tage	0 ng/ml	1	M_01
			2	M_02
			3	M_03
		100 ng/ml	1	M_04
			2	M_05
			3	M_06
		250 ng/ml	1	M_07
			2	M_08
			3	M_09
		500 ng/ml	1	M_10
			2	M_11
			3	M_12
	7 Tage	0 ng/ml	1	M_13
			2	M_14
			3	M_15
		100 ng/ml	1	M_16
			2	M_17
			3	M_18
		250 ng/ml	1	M_19
			2	M_20
			3	M_21
		500 ng/ml	1	M_22
			2	M_23
			3	M_24
	10 Tage	0 ng/ml	1	M_25
			2	M_26
			3	M_27
		100 ng/ml	1	M_29
			2	M_29
			3	M_30
		250 ng/ml	1	M_31
			2	M_32
			3	M_33
		500 ng/ml	1	M_34

Stimulations-Modus	Zeitpunkt	rhBMP7-Konzentration	Biologisches Replikat	Co-Kultivierungs-ID
			2	M_35
			3	M_36
	0 Tage	0 ng/ml	1	M_37
			2	M_38
			3	M_39

10.1.2 ID-Liste für die RNA- beziehungsweise cDNA-Proben

Die nachfolgende Tabelle gibt die Identifikations-Liste, kurz ID-Liste, für die RNA- respektive cDNA-Proben wieder. Dabei verweisen die Identifikations-Präfixe „S_“ beziehungsweise „M_“ in der ID-Spalte auf die singuläre beziehungsweise multiple rhBMP7-Stimulation. Während das Suffix „r“ eine RNA-Probe repräsentiert, dient das Suffix „d“ zur Bezeichnung einer cDNA-Probe.

Stimulations-Modus	Bereich	Zeitpunkt	rhBMP7-Konzentration	Biologisches Replikat	RNA-ID	cDNA-ID
Singuläre rhBMP7-Stimulation	Osteoblasten	3 Tage	0 ng/ml	1	S_001r	S_001d
				2	S_002r	S_002d
				3	S_003r	S_003d
			100 ng/ml	1	S_004r	S_004d
				2	S_005r	S_005d
				3	S_006r	S_006d
			250 ng/ml	1	S_007r	S_007d
				2	S_008r	S_008d
				3	S_009r	S_009d
			500 ng/ml	1	S_010r	S_010d
				2	S_011r	S_011d
				3	S_012r	S_012d
		7 Tage	0 ng/ml	1	S_013r	S_013d
				2	S_014r	S_014d
				3	S_015r	S_015d
			100 ng/ml	1	S_016r	S_016d
				2	S_017r	S_017d
				3	S_018r	S_018d
			250 ng/ml	1	S_019r	S_019d
				2	S_020r	S_020d
				3	S_021r	S_021d
			500 ng/ml	1	S_022r	S_022d
				2	S_023r	S_023d
				3	S_024r	S_024d
		10 Tage	0 ng/ml	1	S_025r	S_025d
				2	S_026r	S_026d

Stimulations-Modus	Bereich	Zeitpunkt	rhBMP7-Konzentration	Biologisches Replikat	RNA-ID	cDNA-ID
				3	S_027r	S_027d
				1	S_028r	S_028d
				2	S_029r	S_029d
			100 ng/ml	3	S_030r	S_030d
				1	S_031r	S_031d
				2	S_032r	S_032d
				3	S_033r	S_033d
			250 ng/ml	1	S_034r	S_034d
				2	S_035r	S_035d
				3	S_036r	S_036d
			500 ng/ml	1	S_037r	S_037d
				2	S_038r	S_038d
				3	S_039r	S_039d
	Fibroblasten	3 Tage	0 ng/ml	1	S_040r	S_040d
				2	S_041r	S_041d
				3	S_042r	S_042d
			100 ng/ml	1	S_043r	S_043d
				2	S_044r	S_044d
				3	S_045r	S_045d
			250 ng/ml	1	S_046r	S_046d
				2	S_047r	S_047d
				3	S_048r	S_048d
			500 ng/ml	1	S_049r	S_049d
				2	S_050r	S_050d
				3	S_051r	S_051d
		7 Tage	0 ng/ml	1	S_052r	S_052d
				2	S_053r	S_053d
				3	S_054r	S_054d
			100 ng/ml	1	S_055r	S_055d
				2	S_056r	S_056d
				3	S_057r	S_057d
			250 ng/ml	1	S_058r	S_058d
				2	S_059r	S_059d
				3	S_060r	S_060d
			500 ng/ml	1	S_061r	S_061d
				2	S_062r	S_062d
				3	S_063r	S_063d
		10 Tage	0 ng/ml	1	S_064r	S_064d
				2	S_065r	S_065d
				3	S_066r	S_066d
			100 ng/ml	1	S_067r	S_067d
				2	S_068r	S_068d
				3	S_069r	S_069d
			250 ng/ml	1	S_070r	S_070d
				2	S_071r	S_071d
				3	S_072r	S_072d
			500 ng/ml	1	S_073r	S_073d
				2	S_074r	S_074d
				3	S_075r	S_075d

Stimulations-Modus	Bereich	Zeitpunkt	rhBMP7-Konzentration	Biologisches Replikat	RNA-ID	cDNA-ID
	Interface	3 Tage	0 ng/ml	1	S_073r	S_073d
				2	S_074r	S_074d
				3	S_075r	S_075d
			100 ng/ml	1	S_076r	S_076d
				2	S_077r	S_077d
				3	S_078r	S_078d
			250 ng/ml	1	S_079r	S_079d
				2	S_080r	S_080d
				3	S_081r	S_081d
			500 ng/ml	1	S_082r	S_082d
				2	S_083r	S_083d
				3	S_084r	S_084d
		7 Tage	0 ng/ml	1	S_085r	S_085d
				2	S_086r	S_086d
				3	S_087r	S_087d
			100 ng/ml	1	S_088r	S_088d
				2	S_089r	S_089d
				3	S_090r	S_090d
			250 ng/ml	1	S_091r	S_091d
				2	S_092r	S_092d
				3	S_093r	S_093d
			500 ng/ml	1	S_094r	S_094d
				2	S_095r	S_095d
				3	S_096r	S_096d
		10 Tage	0 ng/ml	1	S_097r	S_097d
				2	S_098r	S_098d
				3	S_099r	S_099d
			100 ng/ml	1	S_100r	S_100d
				2	S_101r	S_101d
				3	S_102r	S_102d
			250 ng/ml	1	S_103r	S_103d
				2	S_104r	S_104d
				3	S_105r	S_105d
			500 ng/ml	1	S_106r	S_106d
				2	S_107r	S_107d
				3	S_108r	S_108d
	Osteoblasten	0 Tage	0 ng/ml	1	S_109r	S_109d
				2	S_110r	S_110d
				3	S_111r	S_111d
	Fibroblasten	0 Tage	0 ng/ml	1	S_112r	S_112d
				2	S_113r	S_113d
				3	S_114r	S_114d
Multiple rhBMP7-Stimulation	Osteoblasten	3 Tage	0 ng/ml	1	M_001r	M_001d
				2	M_002r	M_002d
				3	M_003r	M_003d

Stimulations-Modus	Bereich	Zeitpunkt	rhBMP7-Konzentration	Biologisches Replikat	RNA-ID	cDNA-ID
			100 ng/ml	1	M_004r	M_004d
				2	M_005r	M_005d
				3	M_006r	M_006d
			250 ng/ml	1	M_007r	M_007d
				2	M_008r	M_008d
				3	M_009r	M_009d
			500 ng/ml	1	M_010r	M_010d
				2	M_011r	M_011d
				3	M_012r	M_012d
		7 Tage	0 ng/ml	1	M_013r	M_013d
				2	M_014r	M_014d
				3	M_015r	M_015d
			100 ng/ml	1	M_016r	M_016d
				2	M_017r	M_017d
				3	M_018r	M_018d
			250 ng/ml	1	M_019r	M_019d
				2	M_020r	M_020d
				3	M_021r	M_021d
			500 ng/ml	1	M_022r	M_022d
				2	M_023r	M_023d
				3	M_024r	M_024d
		10 Tage	0 ng/ml	1	M_025r	M_025d
				2	M_026r	M_026d
				3	M_027r	M_027d
			100 ng/ml	1	M_028r	M_028d
				2	M_029r	M_029d
				3	M_030r	M_030d
			250 ng/ml	1	M_031r	M_031d
				2	M_032r	M_032d
				3	M_033r	M_033d
			500 ng/ml	1	M_034r	M_034d
				2	M_035r	M_035d
				3	M_036r	M_036d
	Fibroblasten	3 Tage	0 ng/ml	1	M_037r	M_037d
				2	M_038r	M_038d
				3	M_039r	M_039d
			100 ng/ml	1	M_040r	M_040d
				2	M_041r	M_041d
				3	M_042r	M_042d
			250 ng/ml	1	M_043r	M_043d
				2	M_044r	M_044d
				3	M_045r	M_045d
			500 ng/ml	1	M_046r	M_046d
				2	M_047r	M_047d
				3	M_048r	M_048d
		7 Tage	0 ng/ml	1	M_049r	M_049d

Stimulations-Modus	Bereich	Zeitpunkt	rhBMP7-Konzentration	Biologisches Replikat	RNA-ID	cDNA-ID
				2	M_050r	M_050d
				3	M_051r	M_051d
				1	M_052r	M_052d
			100 ng/ml	2	M_053r	M_053d
				3	M_054r	M_054d
				1	M_055r	M_055d
			250 ng/ml	2	M_056r	M_056d
				3	M_057r	M_057d
				1	M_058r	M_058d
			500 ng/ml	2	M_059r	M_059d
				3	M_060r	M_060d
				1	M_061r	M_061d
		10 Tage	0 ng/ml	2	M_062r	M_062d
				3	M_063r	M_063d
				1	M_064r	M_064d
			100 ng/ml	2	M_065r	M_065d
				3	M_066r	M_066d
				1	M_067r	M_067d
			250 ng/ml	2	M_068r	M_068d
				3	M_069r	M_069d
				1	M_070r	M_070d
			500 ng/ml	2	M_071r	M_071d
				3	M_072r	M_072d
				1	M_073r	M_073d
	Interface	3 Tage	0 ng/ml	2	M_074r	M_074d
				3	M_075r	M_075d
				1	M_076r	M_076d
			100 ng/ml	2	M_077r	M_077d
				3	M_078r	M_078d
				1	M_079r	M_079d
			250 ng/ml	2	M_080r	M_080d
				3	M_081r	M_081d
				1	M_082r	M_082d
			500 ng/ml	2	M_083r	M_083d
				3	M_084r	M_084d
				1	M_085r	M_085d
		7 Tage	0 ng/ml	2	M_086r	M_086d
				3	M_087r	M_087d
				1	M_088r	M_088d
			100 ng/ml	2	M_089r	M_089d
				3	M_090r	M_090d
				1	M_091r	M_091d
			250 ng/ml	2	M_092r	M_092d
				3	M_093r	M_093d
				1	M_094r	M_094d
			500 ng/ml	2	M_095r	M_095d

Stimulations-Modus	Bereich	Zeitpunkt	rhBMP7-Konzentration	Biologisches Replikat	RNA-ID	cDNA-ID
		10 Tage	0 ng/ml	3	M_096r	M_096d
				1	M_097r	M_097d
				2	M_098r	M_098d
				3	M_099r	M_099d
			100 ng/ml	1	M_100r	M_100d
				2	M_101r	M_101d
				3	M_102r	M_102d
			250 ng/ml	1	M_103r	M_103d
				2	M_104r	M_104d
				3	M_105r	M_105d
			500 ng/ml	1	M_106r	M_106d
				2	M_107r	M_107d
				3	M_108r	M_108d
	Osteoblasten	0 Tage	0 ng/ml	1	M_109r	M_109d
				2	M_110r	M_110d
				3	M_111r	M_111d
	Fibroblasten	0 Tage	0 ng/ml	1	M_112r	M_112d
				2	M_113r	M_113d
				3	M_114r	M_114d

10.1.3 ID-Liste für die Standardreihen der qRT-PCRs

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Zusammensetzungen der Standardreihen für die qRT-PCRs. Dabei kennzeichnen die Präfixe „S_“ und „M_“ die singuläre beziehungsweise die multiple rhBMP7-Applikation. Darüber hinaus steht das Infix „Std“ nachfolgend für die Bezeichnung der Standardreihe.

Verdünnungs-Verhältnis	Zusammensetzung	Gesamtvolumen	Standard-ID
1 : 1 (1 : 10 ⁰)	2 µl aus den cDNA-Proben S_001d bis S_027d	54 µl	S_Std_01
1 : 10 (1 : 10 ¹)	5 µl aus S_Std_01 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_02
1 : 100 (1 : 10 ²)	5 µl aus S_Std_02 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_03
1 : 1000 (1 : 10 ³)	5 µl aus S_Std_03 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_04
1 : 10000 (1 : 10 ⁴)	5 µl aus S_Std_04 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_05
1 : 1 (1 : 10 ⁰)	2 µl aus den cDNA-Proben S_028d bis S_054d	54 µl	S_Std_06
1 : 10 (1 : 10 ¹)	5 µl aus S_Std_06 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_07
1 : 100 (1 : 10 ²)	5 µl aus S_Std_07 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_08
1 : 1000 (1 : 10 ³)	5 µl aus S_Std_08 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_09
1 : 10000 (1 : 10 ⁴)	5 µl aus S_Std_09 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_10
1 : 1 (1 : 10 ⁰)	2 µl aus den cDNA-Proben S_055d bis S_081d	54 µl	S_Std_11
1 : 10 (1 : 10 ¹)	5 µl aus S_Std_11 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_12
1 : 100 (1 : 10 ²)	5 µl aus S_Std_12 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_13
1 : 1000 (1 : 10 ³)	5 µl aus S_Std_13 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_14

Verdünnungs-Verhältnis	Zusammensetzung	Gesamtvolumen	Standard-ID
1: 10000 (1 : 10 ⁴)	5 µl aus S_Std_14 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_15
1 : 1 (1 : 10 ⁰)	2 µl aus den cDNA-Proben S_082d bis S_0108d	54 µl	S_Std_16
1 : 10 (1 : 10 ¹)	5 µl aus S_Std_16 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_17
1 : 100 (1 : 10 ²)	5 µl aus S_Std_17 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_18
1 : 1000 (1 : 10 ³)	5 µl aus S_Std_18 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_19
1: 10000 (1 : 10 ⁴)	5 µl aus S_Std_19 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_20
1 : 1 (1 : 10 ⁰)	6 µl aus den cDNA-Proben S_0109d bis S_0114d	36 µl	S_Std_21
1 : 10 (1 : 10 ¹)	3 µl aus S_Std_21 + 27 µl Nuklease-freies Wasser	30 µl	S_Std_22
1 : 100 (1 : 10 ²)	3 µl aus S_Std_22 + 27 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_23
1 : 1000 (1 : 10 ³)	3 µl aus S_Std_23 + 27 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_24
1: 10000 (1 : 10 ⁴)	3 µl aus S_Std_24 + 27 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	S_Std_25
1 : 1 (1 : 10 ⁰)	2 µl aus den cDNA-Proben M_001d bis M_027d	54 µl	M_Std_01
1 : 10 (1 : 10 ¹)	5 µl aus M_Std_01 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_02
1 : 100 (1 : 10 ²)	5 µl aus M_Std_02 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_03
1 : 1000 (1 : 10 ³)	5 µl aus M_Std_03 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_04
1: 10000 (1 : 10 ⁴)	5 µl aus M_Std_04 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_05
1 : 1 (1 : 10 ⁰)	2 µl aus den cDNA-Proben M_028d bis M_054d	54 µl	M_Std_06
1 : 10 (1 : 10 ¹)	5 µl aus M_Std_06 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_07
1 : 100 (1 : 10 ²)	5 µl aus M_Std_07 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_08
1 : 1000 (1 : 10 ³)	5 µl aus M_Std_08 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_09
1: 10000 (1 : 10 ⁴)	5 µl aus M_Std_09 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_10
1 : 1 (1 : 10 ⁰)	2 µl aus den cDNA-Proben M_055d bis M_081d	54 µl	M_Std_11
1 : 10 (1 : 10 ¹)	5 µl aus M_Std_11 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_12
1 : 100 (1 : 10 ²)	5 µl aus M_Std_12 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_13
1 : 1000 (1 : 10 ³)	5 µl aus M_Std_13 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_14
1: 10000 (1 : 10 ⁴)	5 µl aus M_Std_14 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_15
1 : 1 (1 : 10 ⁰)	2 µl aus den cDNA-Proben M_082d bis M_0108d	54 µl	M_Std_16
1 : 10 (1 : 10 ¹)	5 µl aus M_Std_16 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_17
1 : 100 (1 : 10 ²)	5 µl aus M_Std_17 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_18
1 : 1000 (1 : 10 ³)	5 µl aus M_Std_18 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_19
1: 10000 (1 : 10 ⁴)	5 µl aus M_Std_19 + 45 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_20
1 : 1 (1 : 10 ⁰)	6 µl aus den cDNA-Proben M_0109d bis M_0114d	36 µl	M_Std_21
1 : 10 (1 : 10 ¹)	3 µl aus M_Std_21 + 27 µl Nuklease-freies Wasser	30 µl	M_Std_22
1 : 100 (1 : 10 ²)	3 µl aus M_Std_22 + 27 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_23
1 : 1000 (1 : 10 ³)	3 µl aus M_Std_23 + 27 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_24
1: 10000 (1 : 10 ⁴)	3 µl aus M_Std_24 + 27 µl Nuklease-freies Wasser	50 µl	M_Std_25

10.1.4 ID-Liste für die mikroskopischen Untersuchungen

In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Co-Kultivierungs-Schalen für die mikroskopische Untersuchungen aufgelistet. Dabei steht das Präfix „MI_“ kennzeichnet für die mikroskopische Untersuchung.

Stimulations-Modus	rhBMP7-Konzentration	Biologisches Replikat	Mikroskopie-ID
Kontrolle	0 ng/ml	1	MI_01
	0 ng/ml	2	MI_02
Singuläre rhBMP7-Stimulation	500 ng/ml	1	MI_03
	500 ng/ml	2	MI_04
Multiple rhBMP7-Stimulation	500 ng/ml	1	MI_05
	500 ng/ml	2	MI_06

10.1.5 Ergebnisse der photometrischen RNA-Konzentrations-Bestimmung

Die nachfolgenden Tabellen präsentieren die Ergebnisse der RNA-Konzentrationsmessung für die singuläre respektive multiple rhBMP7-Stimulation. Darüber hinaus sind die Qualitäts-Marker A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} zusätzlich aufgeführt. Das Identifikations-Kürzel „S_“ beziehungsweise „M_“ der RNA-Proben-Nummer wird nachfolgend für die singuläre rhBMP7-Stimulation respektive für die multiple rhBMP7-Applikation verwendet. Das Suffix „r“ steht kennzeichnet für die RNA-Probe (siehe Subkapitel zuvor).

RNA-Konzentration	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	RNA-ID
323,9 µg/ml	2,11	1,00	S_001r
909,0 µg/ml	2,07	2,07	S_002r
645,9 µg/ml	2,08	2,01	S_003r
1411,8 µg/ml	2,12	1,18	S_004r
881,7 µg/ml	2,11	1,62	S_005r
688,3 µg/ml	2,13	1,60	S_006r
427,7 µg/ml	2,09	1,18	S_007r
699,8 µg/ml	2,21	1,35	S_008r
583,5 µg/ml	2,06	1,25	S_009r
523,9 µg/ml	2,05	1,03	S_010r
301,0 µg/ml	2,11	1,97	S_011r
259,3 µg/ml	3,12	1,46	S_012r
635,4 µg/ml	2,11	1,74	S_013r
494,5 µg/ml	2,05	1,00	S_014r
651,8 µg/ml	2,19	2,20	S_015r
504,6 µg/ml	2,09	1,38	S_016r
452,8 µg/ml	2,08	1,26	S_017r
478,7 µg/ml	2,08	2,15	S_018r
340,1 µg/ml	2,10	1,39	S_019r
347,4 µg/ml	2,11	1,20	S_020r
188,5 µg/ml	2,12	1,62	S_021r
961,8 µg/ml	2,19	2,22	S_022r
941,4 µg/ml	2,15	2,22	S_023r
1511,5 µg/ml	2,12	2,22	S_024r
655,5 µg/ml	2,34	1,94	S_025r

RNA-Konzentration	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	RNA-ID
410,0 µg/ml	2,10	1,68	S_026r
672,4 µg/ml	2,25	1,88	S_027r
440,8 µg/ml	2,07	2,15	S_028r
239,0 µg/ml	2,08	2,09	S_029r
174,1 µg/ml	2,13	1,64	S_030r
652,0 µg/ml	2,15	1,95	S_031r
735,1 µg/ml	2,22	1,67	S_032r
773,8 µg/ml	2,23	1,64	S_033r
514,9 µg/ml	2,08	1,84	S_034r
787,2 µg/ml	2,25	2,05	S_035r
461,1 µg/ml	2,09	1,86	S_036r
285,2 µg/ml	2,09	1,80	S_037r
281,8 µg/ml	2,08	2,11	S_038r
303,3 µg/ml	2,11	2,10	S_039r
239,2 µg/ml	2,14	1,41	S_040r
170,6 µg/ml	2,19	1,20	S_041r
164,1 µg/ml	2,14	1,18	S_042r
429,9 µg/ml	2,07	1,68	S_043r
249,3 µg/ml	2,09	1,83	S_044r
233,4 µg/ml	2,05	1,54	S_045r
349,3 µg/ml	2,09	1,80	S_046r
199,7 µg/ml	2,12	2,06	S_047r
221,2 µg/ml	2,10	2,10	S_048r
136,4 µg/ml	2,29	1,13	S_049r
252,4 µg/ml	2,14	1,05	S_050r
115,7 µg/ml	2,11	1,63	S_051r
168,5 µg/ml	2,06	1,63	S_052r
367,9 µg/ml	2,07	2,08	S_053r
423,8 µg/ml	2,08	2,20	S_054r
221,6 µg/ml	2,11	2,12	S_055r
358,2 µg/ml	2,09	2,11	S_056r
294,5 µg/ml	2,11	2,09	S_057r
466,3 µg/ml	1,87	1,05	S_058r
469,1 µg/ml	2,08	1,49	S_059r
267,2 µg/ml	2,12	2,11	S_060r
231,8 µg/ml	2,10	1,75	S_061r
661,9 µg/ml	2,25	1,91	S_062r
83,7 µg/ml	2,08	1,17	S_063r
155,4 µg/ml	2,12	2,10	S_064r
191,3 µg/ml	2,10	2,15	S_065r
144,6 µg/ml	2,12	2,02	S_066r
312,7 µg/ml	2,10	1,82	S_067r
425,7 µg/ml	2,08	1,65	S_068r
368,4 µg/ml	2,13	1,18	S_069r
72,5 µg/ml	1,96	1,19	S_070r
141,8 µg/ml	2,09	1,35	S_071r
219,8 µg/ml	2,09	1,47	S_072r

RNA-Konzentration	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	RNA-ID
112,9 µg/ml	2,14	1,91	S_073r
53,8 µg/ml	2,13	1,35	S_074r
37,7 µg/ml	2,10	1,25	S_075r
374,5 µg/ml	2,07	2,15	S_076r
186,7 µg/ml	2,13	1,67	S_077r
262,8 µg/ml	2,11	1,99	S_078r
268,2 µg/ml	2,10	1,98	S_079r
182,9 µg/ml	2,09	1,19	S_080r
278,9 µg/ml	2,08	1,92	S_081r
33,4 µg/ml	2,14	1,51	S_082r
39,6 µg/ml	2,08	1,78	S_083r
39,8 µg/ml	2,30	1,85	S_084r
278,9 µg/ml	2,10	2,02	S_085r
301,3 µg/ml	2,08	2,05	S_086r
140,6 µg/ml	2,13	1,25	S_087r
171,2 µg/ml	2,01	1,31	S_088r
94,0 µg/ml	2,03	1,55	S_089r
212,5 µg/ml	1,98	1,25	S_090r
64,8 µg/ml	2,20	1,75	S_091r
56,7 µg/ml	2,22	1,76	S_092r
38,6 µg/ml	2,09	1,31	S_093r
949,1 µg/ml	2,11	2,15	S_094r
522,7 µg/ml	2,11	2,11	S_095r
433,4 µg/ml	2,08	1,61	S_096r
162,4 µg/ml	2,07	1,64	S_097r
216,4 µg/ml	2,07	1,80	S_098r
272,3 µg/ml	2,10	2,00	S_099r
38,4 µg/ml	2,32	1,33	S_100r
37,0 µg/ml	1,91	1,56	S_101r
35,2 µg/ml	2,20	1,42	S_102r
249,7 µg/ml	2,10	1,04	S_103r
220,0 µg/ml	2,11	1,68	S_104r
236,4 µg/ml	2,11	1,45	S_105r
353,5 µg/ml	2,10	1,84	S_106r
263,6 µg/ml	2,10	1,44	S_107r
152,6 µg/ml	1,99	1,93	S_108r
790,7 µg/ml	2,14	2,25	S_109r
575,8 µg/ml	2,15	1,31	S_110r
782,5 µg/ml	2,14	1,08	S_111r
461,7 µg/ml	2,00	2,14	S_112r
421,1 µg/ml	2,03	1,12	S_113r
470,1 µg/ml	2,02	1,52	S_114r
272,1 µg/ml	2,11	1,37	M_001r
1312,8 µg/ml	2,10	2,22	M_002r
891,8 µg/ml	2,10	2,20	M_003r
45,5 µg/ml	2,17	1,70	M_004r

RNA-Konzentration	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	RNA-ID
278,2 µg/ml	2,13	1,87	M_005r
584,1 µg/ml	2,09	1,10	M_006r
140,7 µg/ml	2,17	1,36	M_007r
165,0 µg/ml	2,11	1,80	M_008r
260,4 µg/ml	2,10	1,76	M_009r
1008,6 µg/ml	2,09	2,11	M_010r
1126,2 µg/ml	2,11	2,14	M_011r
807,2 µg/ml	2,11	1,64	M_012r
296,6 µg/ml	2,08	1,63	M_013r
293,2 µg/ml	2,12	1,65	M_014r
244,4 µg/ml	2,14	1,71	M_015r
206,4 µg/ml	2,11	1,29	M_016r
362,8 µg/ml	2,09	1,86	M_017r
837,6 µg/ml	2,11	1,68	M_018r
864,5 µg/ml	2,13	1,87	M_019r
573,7 µg/ml	2,17	1,15	M_020r
840,8 µg/ml	2,12	2,12	M_021r
358,8 µg/ml	2,11	1,46	M_022r
412,8 µg/ml	2,07	1,96	M_023r
259,6 µg/ml	2,12	1,15	M_024r
440,9 µg/ml	2,08	1,54	M_025r
250,9 µg/ml	2,06	1,29	M_026r
1063,7 µg/ml	2,10	1,79	M_027r
440,8 µg/ml	2,07	2,15	M_028r
702,4 µg/ml	2,10	1,23	M_029r
174,1 µg/ml	2,13	1,64	M_030r
223,0 µg/ml	2,08	1,95	M_031r
529,3 µg/ml	2,01	1,67	M_032r
220,1 µg/ml	2,10	1,90	M_033r
619,0 µg/ml	2,00	1,06	M_034r
266,0 µg/ml	2,04	1,54	M_035r
1314,7 µg/ml	2,03	1,79	M_036r
117,8 µg/ml	2,11	1,39	M_037r
452,0 µg/ml	2,05	2,16	M_038r
383,8 µg/ml	2,07	2,07	M_039r
64,7 µg/ml	2,30	1,60	M_040r
166,3 µg/ml	2,18	1,73	M_041r
237,8 µg/ml	2,20	1,80	M_042r
159,9 µg/ml	2,18	1,51	M_043r
254,5 µg/ml	2,15	1,83	M_044r
236,3 µg/ml	2,14	1,97	M_045r
159,4 µg/ml	2,11	1,67	M_046r
341,3 µg/ml	2,06	2,01	M_047r
391,0 µg/ml	2,06	2,05	M_048r
179,2 µg/ml	2,19	1,80	M_049r
124,3 µg/ml	2,19	1,80	M_050r
125,4 µg/ml	2,03	1,67	M_051r

RNA-Konzentration	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	RNA-ID
138,2 µg/ml	2,09	1,92	M_052r
44,5 µg/ml	2,20	1,22	M_053r
254,3 µg/ml	2,15	1,76	M_054r
676,1 µg/ml	2,13	1,98	M_055r
456,4 µg/ml	2,07	2,01	M_056r
312,8 µg/ml	2,08	2,14	M_057r
84,8 µg/ml	2,18	1,14	M_058r
38,2 µg/ml	2,17	1,48	M_059r
78,1 µg/ml	2,16	1,21	M_060r
183,6 µg/ml	2,18	1,01	M_061r
271,3 µg/ml	2,15	1,93	M_062r
149,7 µg/ml	2,12	1,09	M_063r
359,0 µg/ml	2,06	2,23	M_064r
293,3 µg/ml	2,11	1,79	M_065r
219,3 µg/ml	2,14	1,38	M_066r
77,4 µg/ml	2,12	1,48	M_067r
43,5 µg/ml	2,15	1,53	M_068r
55,3 µg/ml	2,09	1,45	M_069r
209,8 µg/ml	2,10	1,73	M_070r
154,5 µg/ml	2,07	2,06	M_071r
96,9 µg/ml	2,05	1,62	M_072r
187,1 µg/ml	2,13	1,91	M_073r
128,8 µg/ml	2,14	1,86	M_074r
234,2 µg/ml	2,11	2,12	M_075r
173,9 µg/ml	2,19	1,50	M_076r
224,5 µg/ml	2,11	2,06	M_077r
269,8 µg/ml	2,17	2,04	M_078r
150,1 µg/ml	2,12	1,77	M_079r
200,3 µg/ml	2,17	2,05	M_080r
188,5 µg/ml	2,18	1,15	M_081r
85,9 µg/ml	2,16	1,62	M_082r
89,0 µg/ml	2,12	1,49	M_083r
107,5 µg/ml	2,11	1,75	M_084r
117,7 µg/ml	2,21	1,76	M_085r
43,3 µg/ml	2,27	1,48	M_086r
218,4 µg/ml	2,08	1,91	M_087r
96,3 µg/ml	2,11	1,67	M_088r
131,4 µg/ml	2,11	1,93	M_089r
199,2 µg/ml	2,16	1,52	M_090r
263,8 µg/ml	2,16	1,83	M_091r
314,9 µg/ml	2,07	2,17	M_092r
425,7 µg/ml	2,07	1,81	M_093r
164,3 µg/ml	2,15	1,22	M_094r
165,2 µg/ml	2,20	1,39	M_095r
87,9 µg/ml	2,19	1,47	M_096r
244,2 µg/ml	2,15	1,51	M_097r
160,7 µg/ml	2,16	1,44	M_098r

RNA-Konzentration	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	RNA-ID
375,6 µg/ml	2,13	2,11	M_099r
103,9 µg/ml	2,14	1,38	M_100r
123,3 µg/ml	2,14	1,77	M_101r
391,0 µg/ml	2,09	2,20	M_102r
85,8 µg/ml	2,20	1,40	M_103r
37,8 µg/ml	2,22	1,75	M_104r
37,1 µg/ml	2,09	1,10	M_105r
200,3 µg/ml	2,17	1,87	M_106r
243,6 µg/ml	2,11	1,76	M_107r
161,8 µg/ml	2,05	1,63	M_108r
547,4 µg/ml	2,16	2,24	M_109r
190,4 µg/ml	2,10	0,41	M_110r
702,5 µg/ml	2,16	1,54	M_111r
221,8 µg/ml	2,09	0,99	M_112r
242,8 µg/ml	2,08	0,89	M_113r
233,1 µg/ml	2,09	2,32	M_114r

10.1.6 Ergebnisse der Generierung von cDNA aus genomischer RNA

Die nachfolgenden beiden Tabellen dokumentieren die benötigten Volumina zur Generierung von cDNA aus genomischer RNA für die singuläre und die multiple rhBMP7-Stimulation. Die Präfixe „S_“ und „M_“ der Proben-Nummer repräsentieren die singuläre respektive die multiple rhBMP7-Applikation. Desweiteren wird die Probe mit dem Suffix „r“ als RNA und mit dem Suffix „d“ als cDNA gekennzeichnet.

RNA-ID	RNA-Konzentration	iScript Reaction Mix	iScript Reverse Transcriptase	RNA-Volumen	Nuklease-freies Wasser	Gesamt-volumen	cDNA-ID
S_001r	323,9 µg/ml	8 µl	2 µl	3,1 µg	26,9 µg	40 µl	S_001d
S_002r	909,0 µg/ml	8 µl	2 µl	1,1 µg	28,9 µg	40 µl	S_002d
S_003r	645,9 µg/ml	8 µl	2 µl	1,5 µg	28,5 µg	40 µl	S_003d
S_004r	1411,8 µg/ml	8 µl	2 µl	0,7 µg	29,3 µg	40 µl	S_004d
S_005r	881,7 µg/ml	8 µl	2 µl	1,1 µg	28,9 µg	40 µl	S_005d
S_006r	688,3 µg/ml	8 µl	2 µl	1,5 µg	28,5 µg	40 µl	S_006d
S_007r	427,7 µg/ml	8 µl	2 µl	2,3 µg	27,7 µg	40 µl	S_007d
S_008r	699,8 µg/ml	8 µl	2 µl	1,4 µg	28,6 µg	40 µl	S_008d
S_009r	583,5 µg/ml	8 µl	2 µl	1,7 µg	28,3 µg	40 µl	S_009d
S_010r	523,9 µg/ml	8 µl	2 µl	1,9 µg	28,1 µg	40 µl	S_010d
S_011r	301,0 µg/ml	8 µl	2 µl	3,3 µg	26,7 µg	40 µl	S_011d
S_012r	259,3 µg/ml	8 µl	2 µl	3,9 µg	26,1 µg	40 µl	S_012d
S_013r	635,4 µg/ml	8 µl	2 µl	1,6 µg	28,4 µg	40 µl	S_013d
S_014r	494,5 µg/ml	8 µl	2 µl	2,0 µg	28,0 µg	40 µl	S_014d
S_015r	651,8 µg/ml	8 µl	2 µl	1,5 µg	28,5 µg	40 µl	S_015d

RNA-ID	RNA-Konzentration	iScript Reaction Mix	iScript Reverse Transcriptase	RNA-Volumen	Nuklease-freies Wasser	Gesamt-volumen	cDNA-ID
S_016r	504,6 µg/ml	8 µl	2 µl	2,0 µg	28,0 µg	40 µl	S_016d
S_017r	452,8 µg/ml	8 µl	2 µl	2,2 µg	27,8 µg	40 µl	S_017d
S_018r	478,7 µg/ml	8 µl	2 µl	2,1 µg	27,9 µg	40 µl	S_018d
S_019r	340,1 µg/ml	8 µl	2 µl	2,9 µg	27,1 µg	40 µl	S_019d
S_020r	347,4 µg/ml	8 µl	2 µl	2,9 µg	27,1 µg	40 µl	S_020d
S_021r	188,5 µg/ml	8 µl	2 µl	5,3 µg	24,7 µg	40 µl	S_021d
S_022r	961,8 µg/ml	8 µl	2 µl	1,0 µg	29,0 µg	40 µl	S_022d
S_023r	941,4 µg/ml	8 µl	2 µl	1,1 µg	28,9 µg	40 µl	S_023d
S_024r	1511,5 µg/ml	8 µl	2 µl	0,7 µg	29,3 µg	40 µl	S_024d
S_025r	655,5 µg/ml	8 µl	2 µl	1,5 µg	28,5 µg	40 µl	S_025d
S_026r	410,0 µg/ml	8 µl	2 µl	2,4 µg	27,6 µg	40 µl	S_026d
S_027r	672,4 µg/ml	8 µl	2 µl	1,5 µg	28,5 µg	40 µl	S_027d
S_028r	440,8 µg/ml	8 µl	2 µl	2,3 µg	27,7 µg	40 µl	S_028d
S_029r	239,0 µg/ml	8 µl	2 µl	4,2 µg	25,8 µg	40 µl	S_029d
S_030r	174,1 µg/ml	8 µl	2 µl	5,7 µg	24,3 µg	40 µl	S_030d
S_031r	652,0 µg/ml	8 µl	2 µl	1,5 µg	28,5 µg	40 µl	S_031d
S_032r	735,1 µg/ml	8 µl	2 µl	1,4 µg	28,6 µg	40 µl	S_032d
S_033r	773,8 µg/ml	8 µl	2 µl	1,3 µg	28,7 µg	40 µl	S_033d
S_034r	514,9 µg/ml	8 µl	2 µl	1,9 µg	28,1 µg	40 µl	S_034d
S_035r	787,2 µg/ml	8 µl	2 µl	1,3 µg	28,7 µg	40 µl	S_035d
S_036r	461,1 µg/ml	8 µl	2 µl	2,2 µg	27,8 µg	40 µl	S_036d
S_037r	285,2 µg/ml	8 µl	2 µl	3,5 µg	26,5 µg	40 µl	S_037d
S_038r	281,8 µg/ml	8 µl	2 µl	3,5 µg	26,5 µg	40 µl	S_038d
S_039r	303,3 µg/ml	8 µl	2 µl	3,3 µg	26,7 µg	40 µl	S_039d
S_040r	239,2 µg/ml	8 µl	2 µl	4,2 µg	25,8 µg	40 µl	S_040d
S_041r	170,6 µg/ml	8 µl	2 µl	5,9 µg	24,1 µg	40 µl	S_041d
S_042r	164,1 µg/ml	8 µl	2 µl	6,1 µg	23,9 µg	40 µl	S_042d
S_043r	429,9 µg/ml	8 µl	2 µl	2,3 µg	27,7 µg	40 µl	S_043d
S_044r	249,3 µg/ml	8 µl	2 µl	4,0 µg	26,0 µg	40 µl	S_044d
S_045r	233,4 µg/ml	8 µl	2 µl	4,3 µg	25,7 µg	40 µl	S_045d
S_046r	349,3 µg/ml	8 µl	2 µl	2,9 µg	27,1 µg	40 µl	S_046d
S_047r	199,7 µg/ml	8 µl	2 µl	5,0 µg	25,0 µg	40 µl	S_047d
S_048r	221,2 µg/ml	8 µl	2 µl	4,5 µg	25,5 µg	40 µl	S_048d
S_049r	136,4 µg/ml	8 µl	2 µl	7,3 µg	22,7 µg	40 µl	S_049d
S_050r	252,4 µg/ml	8 µl	2 µl	4,0 µg	26,0 µg	40 µl	S_050d
S_051r	115,7 µg/ml	8 µl	2 µl	8,6 µg	21,4 µg	40 µl	S_051d
S_052r	168,5 µg/ml	8 µl	2 µl	5,9 µg	24,1 µg	40 µl	S_052d
S_053r	367,9 µg/ml	8 µl	2 µl	2,7 µg	27,3 µg	40 µl	S_053d
S_054r	423,8 µg/ml	8 µl	2 µl	2,4 µg	27,6 µg	40 µl	S_054d
S_055r	221,6 µg/ml	8 µl	2 µl	4,5 µg	25,5 µg	40 µl	S_055d
S_056r	358,2 µg/ml	8 µl	2 µl	2,8 µg	27,2 µg	40 µl	S_056d
S_057r	294,5 µg/ml	8 µl	2 µl	3,4 µg	26,6 µg	40 µl	S_057d
S_058r	466,3 µg/ml	8 µl	2 µl	2,1 µg	27,9 µg	40 µl	S_058d
S_059r	469,1 µg/ml	8 µl	2 µl	2,1 µg	27,9 µg	40 µl	S_059d
S_060r	267,2 µg/ml	8 µl	2 µl	3,7 µg	26,3 µg	40 µl	S_060d

RNA-ID	RNA-Konzentration	iScript Reaction Mix	iScript Reverse Transcriptase	RNA-Volumen	Nuklease-freies Wasser	Gesamt-volumen	cDNA-ID
S_061r	231,8 µg/ml	8 µl	2 µl	4,3 µg	25,7 µg	40 µl	S_061d
S_062r	661,9 µg/ml	8 µl	2 µl	1,5 µg	28,5 µg	40 µl	S_062d
S_063r	83,7 µg/ml	8 µl	2 µl	11,9 µg	18,1 µg	40 µl	S_063d
S_064r	155,4 µg/ml	8 µl	2 µl	6,4 µg	23,6 µg	40 µl	S_064d
S_065r	191,3 µg/ml	8 µl	2 µl	5,2 µg	24,8 µg	40 µl	S_065d
S_066r	144,6 µg/ml	8 µl	2 µl	6,9 µg	23,1 µg	40 µl	S_066d
S_067r	312,7 µg/ml	8 µl	2 µl	3,2 µg	26,8 µg	40 µl	S_067d
S_068r	425,7 µg/ml	8 µl	2 µl	2,3 µg	27,7 µg	40 µl	S_068d
S_069r	368,4 µg/ml	8 µl	2 µl	2,7 µg	27,3 µg	40 µl	S_069d
S_070r	72,5 µg/ml	8 µl	2 µl	13,8 µg	16,2 µg	40 µl	S_070d
S_071r	141,8 µg/ml	8 µl	2 µl	7,1 µg	22,9 µg	40 µl	S_071d
S_072r	219,8 µg/ml	8 µl	2 µl	4,5 µg	25,5 µg	40 µl	S_072d
S_073r	112,9 µg/ml	8 µl	2 µl	8,9 µg	21,1 µg	40 µl	S_073d
S_074r	53,8 µg/ml	8 µl	2 µl	18,6 µg	11,4 µg	40 µl	S_074d
S_075r	37,7 µg/ml	8 µl	2 µl	26,5 µg	3,5 µg	40 µl	S_075d
S_076r	374,5 µg/ml	8 µl	2 µl	2,7 µg	27,3 µg	40 µl	S_076d
S_077r	186,7 µg/ml	8 µl	2 µl	5,4 µg	24,6 µg	40 µl	S_077d
S_078r	262,8 µg/ml	8 µl	2 µl	3,8 µg	26,2 µg	40 µl	S_078d
S_079r	268,2 µg/ml	8 µl	2 µl	3,7 µg	26,3 µg	40 µl	S_079d
S_080r	182,9 µg/ml	8 µl	2 µl	5,5 µg	24,5 µg	40 µl	S_080d
S_081r	278,9 µg/ml	8 µl	2 µl	3,6 µg	26,4 µg	40 µl	S_081d
S_082r	33,4 µg/ml	8 µl	2 µl	29,9 µg	0,1 µg	40 µl	S_082d
S_083r	39,6 µg/ml	8 µl	2 µl	25,3 µg	4,7 µg	40 µl	S_083d
S_084r	39,8 µg/ml	8 µl	2 µl	25,1 µg	4,9 µg	40 µl	S_084d
S_085r	278,9 µg/ml	8 µl	2 µl	3,6 µg	26,4 µg	40 µl	S_085d
S_086r	301,3 µg/ml	8 µl	2 µl	3,3 µg	26,7 µg	40 µl	S_086d
S_087r	140,6 µg/ml	8 µl	2 µl	7,1 µg	22,9 µg	40 µl	S_087d
S_088r	171,2 µg/ml	8 µl	2 µl	5,8 µg	24,2 µg	40 µl	S_088d
S_089r	94,0 µg/ml	8 µl	2 µl	10,6 µg	19,4 µg	40 µl	S_089d
S_090r	212,5 µg/ml	8 µl	2 µl	4,7 µg	25,3 µg	40 µl	S_090d
S_091r	64,8 µg/ml	8 µl	2 µl	15,4 µg	14,6 µg	40 µl	S_091d
S_092r	56,7 µg/ml	8 µl	2 µl	17,6 µg	12,4 µg	40 µl	S_092d
S_093r	38,6 µg/ml	8 µl	2 µl	25,9 µg	4,1 µg	40 µl	S_093d
S_094r	949,1 µg/ml	8 µl	2 µl	1,1 µg	28,9 µg	40 µl	S_094d
S_095r	522,7 µg/ml	8 µl	2 µl	1,9 µg	28,1 µg	40 µl	S_095d
S_096r	433,4 µg/ml	8 µl	2 µl	2,3 µg	27,7 µg	40 µl	S_096d
S_097r	162,4 µg/ml	8 µl	2 µl	6,2 µg	23,8 µg	40 µl	S_097d
S_098r	216,4 µg/ml	8 µl	2 µl	4,6 µg	25,4 µg	40 µl	S_098d
S_099r	272,3 µg/ml	8 µl	2 µl	3,7 µg	26,3 µg	40 µl	S_099d
S_100r	38,4 µg/ml	8 µl	2 µl	26,0 µg	4,0 µg	40 µl	S_100d
S_101r	37,0 µg/ml	8 µl	2 µl	27,0 µg	3,0 µg	40 µl	S_101d
S_102r	35,2 µg/ml	8 µl	2 µl	28,4 µg	1,6 µg	40 µl	S_102d
S_103r	249,7 µg/ml	8 µl	2 µl	4,0 µg	26,0 µg	40 µl	S_103d
S_104r	220,0 µg/ml	8 µl	2 µl	4,5 µg	25,5 µg	40 µl	S_104d
S_105r	236,4 µg/ml	8 µl	2 µl	4,2 µg	25,8 µg	40 µl	S_105d

RNA-ID	RNA-Konzentration	iScript Reaction Mix	iScript Reverse Transcriptase	RNA-Volumen	Nuklease-freies Wasser	Gesamt-volumen	cDNA-ID
S_106r	353,5 µg/ml	8 µl	2 µl	2,8 µg	27,2 µg	40 µl	S_106d
S_107r	263,6 µg/ml	8 µl	2 µl	3,8 µg	26,2 µg	40 µl	S_107d
S_108r	152,6 µg/ml	8 µl	2 µl	6,6 µg	23,4 µg	40 µl	S_108d
S_109r	790,7 µg/ml	8 µl	2 µl	1,3 µg	28,7 µg	40 µl	S_109d
S_110r	575,8 µg/ml	8 µl	2 µl	1,7 µg	28,3 µg	40 µl	S_110d
S_111r	782,5 µg/ml	8 µl	2 µl	1,3 µg	28,7 µg	40 µl	S_111d
S_112r	461,7 µg/ml	8 µl	2 µl	2,2 µg	27,8 µg	40 µl	S_112d
S_113r	421,1 µg/ml	8 µl	2 µl	2,4 µg	27,6 µg	40 µl	S_113d
S_114r	470,1 µg/ml	8 µl	2 µl	2,1 µg	27,9 µg	40 µl	S_114d
M_001r	272,1 µg/ml	8 µl	2 µl	3,7 µg	26,3 µg	40 µl	M_001d
M_002r	1312,8 µg/ml	8 µl	2 µl	0,8 µg	29,2 µg	40 µl	M_002d
M_003r	891,8 µg/ml	8 µl	2 µl	1,1 µg	28,9 µg	40 µl	M_003d
M_004r	45,5 µg/ml	8 µl	2 µl	22,0 µg	8,0 µg	40 µl	M_004d
M_005r	278,2 µg/ml	8 µl	2 µl	3,6 µg	26,4 µg	40 µl	M_005d
M_006r	584,1 µg/ml	8 µl	2 µl	1,7 µg	28,3 µg	40 µl	M_006d
M_007r	140,7 µg/ml	8 µl	2 µl	7,1 µg	22,9 µg	40 µl	M_007d
M_008r	165,0 µg/ml	8 µl	2 µl	6,1 µg	23,9 µg	40 µl	M_008d
M_009r	260,4 µg/ml	8 µl	2 µl	3,8 µg	26,2 µg	40 µl	M_009d
M_010r	1008,6 µg/ml	8 µl	2 µl	1,0 µg	29,0 µg	40 µl	M_010d
M_011r	1126,2 µg/ml	8 µl	2 µl	0,9 µg	29,1 µg	40 µl	M_011d
M_012r	807,2 µg/ml	8 µl	2 µl	1,2 µg	28,8 µg	40 µl	M_012d
M_013r	296,6 µg/ml	8 µl	2 µl	3,4 µg	26,6 µg	40 µl	M_013d
M_014r	293,2 µg/ml	8 µl	2 µl	3,4 µg	26,6 µg	40 µl	M_014d
M_015r	244,4 µg/ml	8 µl	2 µl	4,1 µg	25,9 µg	40 µl	M_015d
M_016r	206,4 µg/ml	8 µl	2 µl	4,8 µg	25,2 µg	40 µl	M_016d
M_017r	362,8 µg/ml	8 µl	2 µl	2,8 µg	27,2 µg	40 µl	M_017d
M_018r	837,6 µg/ml	8 µl	2 µl	1,2 µg	28,8 µg	40 µl	M_018d
M_019r	864,5 µg/ml	8 µl	2 µl	1,2 µg	28,8 µg	40 µl	M_019d
M_020r	573,7 µg/ml	8 µl	2 µl	1,7 µg	28,3 µg	40 µl	M_020d
M_021r	840,8 µg/ml	8 µl	2 µl	1,2 µg	28,8 µg	40 µl	M_021d
M_022r	358,8 µg/ml	8 µl	2 µl	2,8 µg	27,2 µg	40 µl	M_022d
M_023r	412,8 µg/ml	8 µl	2 µl	2,4 µg	27,6 µg	40 µl	M_023d
M_024r	259,6 µg/ml	8 µl	2 µl	3,9 µg	26,1 µg	40 µl	M_024d
M_025r	440,9 µg/ml	8 µl	2 µl	2,3 µg	27,7 µg	40 µl	M_025d
M_026r	250,9 µg/ml	8 µl	2 µl	4,0 µg	26,0 µg	40 µl	M_026d
M_027r	1063,7 µg/ml	8 µl	2 µl	0,9 µg	29,1 µg	40 µl	M_027d
M_028r	440,8 µg/ml	8 µl	2 µl	2,3 µg	27,7 µg	40 µl	M_028d
M_029r	702,4 µg/ml	8 µl	2 µl	1,4 µg	28,6 µg	40 µl	M_029d
M_030r	174,1 µg/ml	8 µl	2 µl	5,7 µg	24,3 µg	40 µl	M_030d
M_031r	223,0 µg/ml	8 µl	2 µl	4,5 µg	25,5 µg	40 µl	M_031d
M_032r	529,3 µg/ml	8 µl	2 µl	1,9 µg	28,1 µg	40 µl	M_032d
M_033r	220,1 µg/ml	8 µl	2 µl	4,5 µg	25,5 µg	40 µl	M_033d
M_034r	619,0 µg/ml	8 µl	2 µl	1,6 µg	28,4 µg	40 µl	M_034d
M_035r	266,0 µg/ml	8 µl	2 µl	3,8 µg	26,2 µg	40 µl	M_035d

RNA-ID	RNA-Konzentration	iScript Reaction Mix	iScript Reverse Transcriptase	RNA-Volumen	Nuklease-freies Wasser	Gesamt-volumen	cDNA-ID
M_036r	1314,7 µg/ml	8 µl	2 µl	0,8 µg	29,2 µg	40 µl	M_036d
M_037r	117,8 µg/ml	8 µl	2 µl	8,5 µg	21,5 µg	40 µl	M_037d
M_038r	452,0 µg/ml	8 µl	2 µl	2,2 µg	27,8 µg	40 µl	M_038d
M_039r	383,8 µg/ml	8 µl	2 µl	2,6 µg	27,4 µg	40 µl	M_039d
M_040r	64,7 µg/ml	8 µl	2 µl	15,5 µg	14,5 µg	40 µl	M_040d
M_041r	166,3 µg/ml	8 µl	2 µl	6,0 µg	24,0 µg	40 µl	M_041d
M_042r	237,8 µg/ml	8 µl	2 µl	4,2 µg	25,8 µg	40 µl	M_042d
M_043r	159,9 µg/ml	8 µl	2 µl	6,3 µg	23,7 µg	40 µl	M_043d
M_044r	254,5 µg/ml	8 µl	2 µl	3,9 µg	26,1 µg	40 µl	M_044d
M_045r	236,3 µg/ml	8 µl	2 µl	4,2 µg	25,8 µg	40 µl	M_045d
M_046r	159,4 µg/ml	8 µl	2 µl	6,3 µg	23,7 µg	40 µl	M_046d
M_047r	341,3 µg/ml	8 µl	2 µl	2,9 µg	27,1 µg	40 µl	M_047d
M_048r	391,0 µg/ml	8 µl	2 µl	2,6 µg	27,4 µg	40 µl	M_048d
M_049r	179,2 µg/ml	8 µl	2 µl	5,6 µg	24,4 µg	40 µl	M_049d
M_050r	124,3 µg/ml	8 µl	2 µl	8,0 µg	22,0 µg	40 µl	M_050d
M_051r	125,4 µg/ml	8 µl	2 µl	8,0 µg	22,0 µg	40 µl	M_051d
M_052r	138,2 µg/ml	8 µl	2 µl	7,2 µg	22,8 µg	40 µl	M_052d
M_053r	44,5 µg/ml	8 µl	2 µl	22,5 µg	7,5 µg	40 µl	M_053d
M_054r	254,3 µg/ml	8 µl	2 µl	3,9 µg	26,1 µg	40 µl	M_054d
M_055r	676,1 µg/ml	8 µl	2 µl	1,5 µg	28,5 µg	40 µl	M_055d
M_056r	456,4 µg/ml	8 µl	2 µl	2,2 µg	27,8 µg	40 µl	M_056d
M_057r	312,8 µg/ml	8 µl	2 µl	3,2 µg	26,8 µg	40 µl	M_057d
M_058r	84,8 µg/ml	8 µl	2 µl	11,8 µg	18,2 µg	40 µl	M_058d
M_059r	38,2 µg/ml	8 µl	2 µl	26,2 µg	3,8 µg	40 µl	M_059d
M_060r	78,1 µg/ml	8 µl	2 µl	12,8 µg	17,2 µg	40 µl	M_060d
M_061r	183,6 µg/ml	8 µl	2 µl	5,4 µg	24,6 µg	40 µl	M_061d
M_062r	271,3 µg/ml	8 µl	2 µl	3,7 µg	26,3 µg	40 µl	M_062d
M_063r	149,7 µg/ml	8 µl	2 µl	6,7 µg	23,3 µg	40 µl	M_063d
M_064r	359,0 µg/ml	8 µl	2 µl	2,8 µg	27,2 µg	40 µl	M_064d
M_065r	293,3 µg/ml	8 µl	2 µl	3,4 µg	26,6 µg	40 µl	M_065d
M_066r	219,3 µg/ml	8 µl	2 µl	4,6 µg	25,4 µg	40 µl	M_066d
M_067r	77,4 µg/ml	8 µl	2 µl	12,9 µg	17,1 µg	40 µl	M_067d
M_068r	43,5 µg/ml	8 µl	2 µl	23,0 µg	7,0 µg	40 µl	M_068d
M_069r	55,3 µg/ml	8 µl	2 µl	18,1 µg	11,9 µg	40 µl	M_069d
M_070r	209,8 µg/ml	8 µl	2 µl	4,8 µg	25,2 µg	40 µl	M_070d
M_071r	154,5 µg/ml	8 µl	2 µl	6,5 µg	23,5 µg	40 µl	M_071d
M_072r	96,9 µg/ml	8 µl	2 µl	10,3 µg	19,7 µg	40 µl	M_072d
M_073r	187,1 µg/ml	8 µl	2 µl	5,3 µg	24,7 µg	40 µl	M_073d
M_074r	128,8 µg/ml	8 µl	2 µl	7,8 µg	22,2 µg	40 µl	M_074d
M_075r	234,2 µg/ml	8 µl	2 µl	4,3 µg	25,7 µg	40 µl	M_075d
M_076r	173,9 µg/ml	8 µl	2 µl	5,8 µg	24,2 µg	40 µl	M_076d
M_077r	224,5 µg/ml	8 µl	2 µl	4,5 µg	25,5 µg	40 µl	M_077d
M_078r	269,8 µg/ml	8 µl	2 µl	3,7 µg	26,3 µg	40 µl	M_078d
M_079r	150,1 µg/ml	8 µl	2 µl	6,7 µg	23,3 µg	40 µl	M_079d
M_080r	200,3 µg/ml	8 µl	2 µl	5,0 µg	25,0 µg	40 µl	M_080d

RNA-ID	RNA-Konzentration	iScript Reaction Mix	iScript Reverse Transcriptase	RNA-Volumen	Nuklease-freies Wasser	Gesamt-volumen	cDNA-ID
M_081r	188,5 µg/ml	8 µl	2 µl	5,3 µg	24,7 µg	40 µl	M_081d
M_082r	85,9 µg/ml	8 µl	2 µl	11,6 µg	18,4 µg	40 µl	M_082d
M_083r	89,0 µg/ml	8 µl	2 µl	11,2 µg	18,8 µg	40 µl	M_083d
M_084r	107,5 µg/ml	8 µl	2 µl	9,3 µg	20,7 µg	40 µl	M_084d
M_085r	117,7 µg/ml	8 µl	2 µl	8,5 µg	21,5 µg	40 µl	M_085d
M_086r	43,3 µg/ml	8 µl	2 µl	23,1 µg	6,9 µg	40 µl	M_086d
M_087r	218,4 µg/ml	8 µl	2 µl	4,6 µg	25,4 µg	40 µl	M_087d
M_088r	96,3 µg/ml	8 µl	2 µl	10,4 µg	19,6 µg	40 µl	M_088d
M_089r	131,4 µg/ml	8 µl	2 µl	7,6 µg	22,4 µg	40 µl	M_089d
M_090r	199,2 µg/ml	8 µl	2 µl	5,0 µg	25,0 µg	40 µl	M_090d
M_091r	263,8 µg/ml	8 µl	2 µl	3,8 µg	26,2 µg	40 µl	M_091d
M_092r	314,9 µg/ml	8 µl	2 µl	3,2 µg	26,8 µg	40 µl	M_092d
M_093r	425,7 µg/ml	8 µl	2 µl	2,3 µg	27,7 µg	40 µl	M_093d
M_094r	164,3 µg/ml	8 µl	2 µl	6,1 µg	23,9 µg	40 µl	M_094d
M_095r	165,2 µg/ml	8 µl	2 µl	6,1 µg	23,9 µg	40 µl	M_095d
M_096r	87,9 µg/ml	8 µl	2 µl	11,4 µg	18,6 µg	40 µl	M_096d
M_097r	244,2 µg/ml	8 µl	2 µl	4,1 µg	25,9 µg	40 µl	M_097d
M_098r	160,7 µg/ml	8 µl	2 µl	6,2 µg	23,8 µg	40 µl	M_098d
M_099r	375,6 µg/ml	8 µl	2 µl	2,7 µg	27,3 µg	40 µl	M_099d
M_100r	103,9 µg/ml	8 µl	2 µl	9,6 µg	20,4 µg	40 µl	M_100d
M_101r	123,3 µg/ml	8 µl	2 µl	8,1 µg	21,9 µg	40 µl	M_101d
M_102r	391,0 µg/ml	8 µl	2 µl	2,6 µg	27,4 µg	40 µl	M_102d
M_103r	85,8 µg/ml	8 µl	2 µl	11,7 µg	18,3 µg	40 µl	M_103d
M_104r	37,8 µg/ml	8 µl	2 µl	26,5 µg	3,5 µg	40 µl	M_104d
M_105r	37,1 µg/ml	8 µl	2 µl	27,0 µg	3,0 µg	40 µl	M_105d
M_106r	200,3 µg/ml	8 µl	2 µl	5,0 µg	25,0 µg	40 µl	M_106d
M_107r	243,6 µg/ml	8 µl	2 µl	4,1 µg	25,9 µg	40 µl	M_107d
M_108r	161,8 µg/ml	8 µl	2 µl	6,2 µg	23,8 µg	40 µl	M_108d
M_109r	547,4 µg/ml	8 µl	2 µl	1,8 µg	28,2 µg	40 µl	M_109d
M_110r	190,4 µg/ml	8 µl	2 µl	5,3 µg	24,7 µg	40 µl	M_110d
M_111r	702,5 µg/ml	8 µl	2 µl	1,4 µg	28,6 µg	40 µl	M_111d
M_112r	221,8 µg/ml	8 µl	2 µl	4,5 µg	25,5 µg	40 µl	M_112d
M_113r	242,8 µg/ml	8 µl	2 µl	4,1 µg	25,9 µg	40 µl	M_113d
M_114r	233,1 µg/ml	8 µl	2 µl	4,3 µg	25,7 µg	40 µl	M_114d

10.1.7 Ergebnisse der Verdünnung der cDNA

Wie im vorherigen Abschnitt zuvor beschrieben, ergeben sich für die singuläre als auch die multiple rhBMP7-Stimulation jeweils 114 Proben, die das Transkriptom in Form einer cDNA zu den untersuchten Zeitpunkten, für die unterschiedlichen Konzentrationen und für die verschiedenen Bereiche widerspiegeln. Jeder cDNA-Ansatz umfasst dabei ein Gesamtvolumen von 40 µl.

Da in den zugrundeliegenden Untersuchungen zahlreiche Zielgene untersucht wurden, wurde ein höheres Volumen als das Ausgangsvolumen von 40 µl benötigt. Dazu wurde jedem unverdünnten cDNA-Ansatz 20 µl Volumen entnommen und anschließend 60 µl Nuklease-freies Wasser hinzugefügt. Es ergibt sich damit ein Mischungsverhältnis von 1:3 (20 µl cDNA-Ansatz zu 60 µl RNA-freies Wasser) beziehungsweise ein Verdünnungsverhältnis von 1:4 (20 µl cDNA-Ansatz in insgesamt 80 µl Gesamtvolumen)). Diese Verdünnungsstufen wurden anschließend für die qRT-PCR-Reaktionen verwendet.

10.1.8 Ergebnisse des PCR-Platten-Designs für die qRT-PCR-Durchführung

Die nachfolgenden Abbildungen zeigten die PCR-Platten-Schemata für die cDNA-Proben des singulären und des multiplen rhBMP7-Stimulationsversuches und für die untersuchten Zielgene Runx2, Col1a1, Alp1, Spp1 und Bglap sowie für die Referenzgene Actb und Hprt.

Es wurden jeweils drei technischen Replikate pro cDNA-Ansatz angefertigt, die nachfolgend mit „TR 1“, „TR 2“ und „TR 3“ bezeichnet werden. Die cDNA-Proben und Standardreihen-Proben sind nach den in den vorherigen Unterkapiteln aufgeführten ID-Listen bezeichnet. Darüber hinaus werden die Negativ-Kontrollen – diese enthalten keine cDNA; dem qRT-PCR-Ansatz wurde lediglich Nuklease-freies Wasser hinzugefügt – als NTC (non treated control) bezeichnet.

Für die singuläre Stimulation mit rhBMP7-Stimulation in Dosierungen von 0 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml rhBMP7 und für jedes in der vorliegenden Arbeit untersuchte Ziel- und Referenzgene (Runx2, Col1a1, Alp1, Spp1, Bglap, Actb, Hprt) ergeben sich die nachfolgenden PCR-Designs beziehungsweise -Schemata.

0 ng/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S_001d TR 1	S_001d TR 2	S_001d TR 3	S_013d TR 1	S_013d TR 2	S_013d TR 3	S_025d TR 1	S_025d TR 2	S_025d TR 3	S_075d TR 1	S_Std_01 TR 1	S_Std_01 TR 2
B	S_002d TR 1	S_002d TR 2	S_002d TR 3	S_014d TR 1	S_014d TR 2	S_014d TR 3	S_026d TR 1	S_026d TR 2	S_026d TR 3	S_075d TR 2	S_Std_02 TR 1	S_Std_02 TR 2
C	S_003d TR 1	S_003d TR 2	S_003d TR 3	S_015d TR 1	S_015d TR 2	S_015d TR 3	S_027d TR 1	S_027d TR 2	S_027d TR 3	S_075d TR 3	S_Std_03 TR 1	S_Std_03 TR 2
D	S_037d TR 1	S_037d TR 2	S_037d TR 3	S_049d TR 1	S_049d TR 2	S_049d TR 3	S_061d TR 1	S_061d TR 2	S_061d TR 3	S_087d TR 1	S_Std_04 TR 1	S_Std_04 TR 2
E	S_038d TR 1	S_038d TR 2	S_038d TR 3	S_050d TR 1	S_050d TR 2	S_050d TR 3	S_062d TR 1	S_062d TR 2	S_062d TR 3	S_087d TR 2	S_Std_05 TR 1	S_Std_05 TR 2
F	S_039d TR 1	S_039d TR 2	S_039d TR 3	S_051d TR 1	S_051d TR 2	S_051d TR 3	S_063d TR 1	S_063d TR 2	S_063d TR 3	S_087d TR 3	NTC TR 1	NTC TR 2
G	S_073d TR 1	S_073d TR 2	S_073d TR 3	S_085d TR 1	S_085d TR 2	S_085d TR 3	S_097d TR 1	S_097d TR 2	S_097d TR 3	S_099d TR 1		
H	S_074d TR 1	S_074d TR 2	S_074d TR 3	S_086d TR 1	S_086d TR 2	S_085d TR 3	S_098d TR 1	S_098d TR 2	S_098d TR 3	S_099d TR 2	S_099d TR 3	

100 ng/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S_004d	S_004d	S_004d	S_016d	S_016d	S_016d	S_028d	S_028d	S_028d	S_078d	S_Std_06	S_Std_06
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
B	S_005d	S_005d	S_005d	S_017d	S_017d	S_017d	S_029d	S_029d	S_029d	S_078d	S_Std_07	S_Std_07
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
C	S_006d	S_006d	S_006d	S_018d	S_018d	S_018d	S_030d	S_030d	S_030d	S_078d	S_Std_08	S_Std_08
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
D	S_040d	S_040d	S_040d	S_052d	S_052d	S_052d	S_064d	S_064d	S_064d	S_090d	S_Std_09	S_Std_09
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
E	S_041d	S_041d	S_041d	S_053d	S_053d	S_053d	S_065d	S_065d	S_065d	S_090d	S_Std_10	S_Std_10
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
F	S_042d	S_042d	S_042d	S_054d	S_054d	S_054d	S_066d	S_066d	S_066d	S_090d	NTC	NTC
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
G	S_076d	S_076d	S_076d	S_088d	S_088d	S_088d	S_100d	S_100d	S_100d	S_102d		
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1		
H	S_077d	S_077d	S_077d	S_089d	S_089d	S_089d	S_101d	S_101d	S_101d	S_102d	S_102d	
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 3	

250 ng/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S_007d	S_007d	S_007d	S_019d	S_019d	S_019d	S_031d	S_031d	S_031d	S_081d	S_Std_11	S_Std_11
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
B	S_008d	S_008d	S_008d	S_020d	S_020d	S_020d	S_032d	S_032d	S_032d	S_081d	S_Std_12	S_Std_12
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
C	S_009d	S_009d	S_009d	S_021d	S_021d	S_021d	S_033d	S_033d	S_033d	S_081d	S_Std_13	S_Std_13
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
D	S_043d	S_043d	S_043d	S_055d	S_055d	S_055d	S_067d	S_067d	S_067d	S_093d	S_Std_14	S_Std_14
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
E	S_044d	S_044d	S_044d	S_056d	S_056d	S_056d	S_068d	S_068d	S_068d	S_093d	S_Std_15	S_Std_15
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
F	S_045d	S_045d	S_045d	S_057d	S_057d	S_057d	S_069d	S_069d	S_069d	S_093d	NTC	NTC
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
G	S_079d	S_079d	S_079d	S_091d	S_091d	S_091d	S_103d	S_103d	S_103d	S_105d		
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1		
H	S_080d	S_080d	S_080d	S_092d	S_092d	S_092d	S_104d	S_104d	S_104d	S_105d	S_105d	
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 3	

500 ng/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S_010d	S_010d	S_010d	S_022d	S_022d	S_022d	S_034d	S_034d	S_034d	S_084d	S_Std_16	S_Std_16
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
B	S_011d	S_011d	S_011d	S_023d	S_023d	S_023d	S_035d	S_035d	S_035d	S_084d	S_Std_17	S_Std_17
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
C	S_012d	S_012d	S_012d	S_024d	S_024d	S_024d	S_036d	S_036d	S_036d	S_084d	S_Std_18	S_Std_18
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
D	S_046d	S_046d	S_046d	S_058d	S_058d	S_058d	S_070d	S_070d	S_070d	S_096d	S_Std_19	S_Std_19
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
E	S_047d	S_047d	S_047d	S_059d	S_059d	S_059d	S_071d	S_071d	S_071d	S_096d	S_Std_20	S_Std_20
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
F	S_048d	S_048d	S_048d	S_060d	S_060d	S_060d	S_072d	S_072d	S_072d	S_096d	NTC	NTC
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
G	S_082d	S_082d	S_082d	S_094d	S_094d	S_094d	S_106d	S_106d	S_106d	S_108d		
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1		
H	S_083d	S_083d	S_083d	S_095d	S_095d	S_095d	S_107d	S_107d	S_107d	S_108d	S_108d	
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 3	

Analog zu den zuvor genannten PCR-Platten-Schemata für die singuläre Stimulation sind nachfolgend die PCR-Platten-Designs für die multiple rhBMP7-Applikation in den

unterschiedlichen untersuchten Konzentrationen und für die in dieser Arbeit analysierten Gene dargestellt.

0 ng/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M_001d	M_001d	M_001d	M_013d	M_013d	M_013d	M_025d	M_025d	M_025d	M_075d	M_Std_01	M_Std_01
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
B	M_002d	M_002d	M_002d	M_014d	M_014d	M_014d	M_026d	M_026d	M_026d	M_075d	M_Std_02	M_Std_02
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
C	M_003d	M_003d	M_003d	M_015d	M_015d	M_015d	M_027d	M_027d	M_027d	M_075d	M_Std_03	M_Std_03
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
D	M_037d	M_037d	M_037d	M_049d	M_049d	M_049d	M_061d	M_061d	M_061d	M_087d	M_Std_04	M_Std_04
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
E	M_038d	M_038d	M_038d	M_050d	M_050d	M_050d	M_062d	M_062d	M_062d	M_087d	M_Std_05	M_Std_05
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
F	M_039d	M_039d	M_039d	M_051d	M_051d	M_051d	M_063d	M_063d	M_063d	M_087d	NTC	NTC
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
G	M_073d	M_073d	M_073d	M_085d	M_085d	M_085d	M_097d	M_097d	M_097d	M_099d		
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1		
H	M_074d	M_074d	M_074d	M_086d	M_086d	M_085d	M_098d	M_098d	M_098d	M_099d	M_099d	
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 3	

100 ng/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M_004d	M_004d	M_004d	M_016d	M_016d	M_016d	M_028d	M_028d	M_028d	M_078d	M_Std_06	M_Std_06
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
B	M_005d	M_005d	M_005d	M_017d	M_017d	M_017d	M_029d	M_029d	M_029d	M_078d	M_Std_07	M_Std_07
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
C	M_006d	M_006d	M_006d	M_018d	M_018d	M_018d	M_030d	M_030d	M_030d	M_078d	M_Std_08	M_Std_08
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
D	M_040d	M_040d	M_040d	M_052d	M_052d	M_052d	M_064d	M_064d	M_064d	M_090d	M_Std_09	M_Std_09
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
E	M_041d	M_041d	M_041d	M_053d	M_053d	M_053d	M_065d	M_065d	M_065d	M_090d	M_Std_10	M_Std_10
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
F	M_042d	M_042d	M_042d	M_054d	M_054d	M_054d	M_066d	M_066d	M_066d	M_090d	NTC	NTC
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
G	M_076d	M_076d	M_076d	M_088d	M_088d	M_088d	M_100d	M_100d	M_100d	M_102d		
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1		
H	M_077d	M_077d	M_077d	M_089d	M_089d	M_089d	M_101d	M_101d	M_101d	M_102d	M_102d	
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 3	

250 ng/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M_007d	M_007d	M_007d	M_019d	M_019d	M_019d	M_031d	M_031d	M_031d	M_081d	M_Std_11	M_Std_11
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
B	M_008d	M_008d	M_008d	M_020d	M_020d	M_020d	M_032d	M_032d	M_032d	M_081d	M_Std_12	M_Std_12
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
C	M_009d	M_009d	M_009d	M_021d	M_021d	M_021d	M_033d	M_033d	M_033d	M_081d	M_Std_13	M_Std_13
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
D	M_043d	M_043d	M_043d	M_055d	M_055d	M_055d	M_067d	M_067d	M_067d	M_093d	M_Std_14	M_Std_14
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
E	M_044d	M_044d	M_044d	M_056d	M_056d	M_056d	M_068d	M_068d	M_068d	M_093d	M_Std_15	M_Std_15
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
F	M_045d	M_045d	M_045d	M_057d	M_057d	M_057d	M_069d	M_069d	M_069d	M_093d	NTC	NTC
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 3	TR 1	TR 2
G	M_079d	M_079d	M_079d	M_091d	M_091d	M_091d	M_103d	M_103d	M_103d	M_105d		
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1		
H	M_080d	M_080d	M_080d	M_092d	M_092d	M_092d	M_104d	M_104d	M_104d	M_105d	M_105d	
	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 3	

500 ng/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M_010d TR 1	M_010d TR 2	M_010d TR 3	M_022d TR 1	M_022d TR 2	M_022d TR 3	M_034d TR 1	M_034d TR 2	M_034d TR 3	M_084d TR 1	M_Std_16 TR 1	M_Std_16 TR 2
B	M_011d TR 1	M_011d TR 2	M_011d TR 3	M_023d TR 1	M_023d TR 2	M_023d TR 3	M_035d TR 1	M_035d TR 2	M_035d TR 3	M_084d TR 2	M_Std_17 TR 1	M_Std_17 TR 2
C	M_012d TR 1	M_012d TR 2	M_012d TR 3	M_024d TR 1	M_024d TR 2	M_024d TR 3	M_036d TR 1	M_036d TR 2	M_036d TR 3	M_084d TR 3	M_Std_18 TR 1	M_Std_18 TR 2
D	M_046d TR 1	M_046d TR 2	M_046d TR 3	M_058d TR 1	M_058d TR 2	M_058d TR 3	M_070d TR 1	M_070d TR 2	M_070d TR 3	M_096d TR 1	M_Std_19 TR 1	M_Std_19 TR 2
E	M_047d TR 1	M_047d TR 2	M_047d TR 3	M_059d TR 1	M_059d TR 2	M_059d TR 3	M_071d TR 1	M_071d TR 2	M_071d TR 3	M_096d TR 2	M_Std_20 TR 1	M_Std_20 TR 2
F	M_048d TR 1	M_048d TR 2	M_048d TR 3	M_060d TR 1	M_060d TR 2	M_060d TR 3	M_072d TR 1	M_072d TR 2	M_072d TR 3	M_096d TR 3	NTC TR 1	NTC TR 2
G	M_082d TR 1	M_082d TR 2	M_082d TR 3	M_094d TR 1	M_094d TR 2	M_094d TR 3	M_106d TR 1	M_106d TR 2	M_106d TR 3	M_108d TR 1		
H	M_083d TR 1	M_083d TR 2	M_083d TR 3	M_095d TR 1	M_095d TR 2	M_095d TR 3	M_107d TR 1	M_107d TR 2	M_107d TR 3	M_108d TR 2	M_108d TR 3	

Für die Auswertung der Expressionswerte wurden unstimulierte Kontrollen als Referenzierung beziehungsweise als Normierung hinzugezogen. Die zugehörigen PCR-Platten-Schemata sind nachfolgend dargestellt sowohl für den Osteoblasten- als auch den Fibroblasten-Bereich.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S_109d	S_109d	S_109d	S_110d	S_110d	S_110d	S_111d	S_111d	S_111d	S_Std_16	S_Std_16	S_Std_17
Runx2	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 1
B	S_109d	S_109d	S_109d	S_110d	S_110d	S_110d	S_111d	S_111d	S_111d	S_Std_17	S_Std_18	S_Std_18
Col1a1	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
C	S_109d	S_109d	S_109d	S_110d	S_110d	S_110d	S_111d	S_111d	S_111d	S_Std_19	S_Std_19	S_Std_20
Alp1	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 1
D	S_109d	S_109d	S_109d	S_110d	S_110d	S_110d	S_111d	S_111d	S_111d	S_Std_20	NTC	NTC
Spp1	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
E	S_109d	S_109d	S_109d	S_110d	S_110d	S_110d	S_111d	S_111d	S_111d			
Bglap	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3			
F	S_109d	S_109d	S_109d	S_110d	S_110d	S_110d	S_111d	S_111d	S_111d			
Actb	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3			
G	S_109d	S_109d	S_109d	S_110d	S_110d	S_110d	S_111d	S_111d	S_111d			
Hprt	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3			
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M_109d	M_109d	M_109d	M_110d	M_110d	M_110d	M_111d	M_111d	M_111d	M_Std_16	M_Std_16	M_Std_17
Runx2	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 1
B	M_109d	M_109d	M_109d	M_110d	M_110d	M_110d	M_111d	M_111d	M_111d	M_Std_17	M_Std_18	M_Std_18
Col1a1	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 2	TR 1	TR 2
C	M_109d	M_109d	M_109d	M_110d	M_110d	M_110d	M_111d	M_111d	M_111d	M_Std_19	M_Std_19	M_Std_20
Alp1	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 1
D	M_109d	M_109d	M_109d	M_110d	M_110d	M_110d	M_111d	M_111d	M_111d	M_Std_20	NTC	NTC
Spp1	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 1	TR 2
E	M_109d	M_109d	M_109d	M_110d	M_110d	M_110d	M_111d	M_111d	M_111d			
Bglap	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3			
F	M_109d	M_109d	M_109d	M_110d	M_110d	M_110d	M_111d	M_111d	M_111d			
Actb	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3			
G	M_109d	M_109d	M_109d	M_110d	M_110d	M_110d	M_111d	M_111d	M_111d			
Hprt	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3	TR 1	TR 2	TR 3			
H												

10.1.9 Ergebnisse der qRT-PCRs-Effizienzanalyse

Die nachfolgende Tabelle listet die qRT-PCR-Effizienzen der untersuchten Ziel- und Referenzgene für die singulären rhBMP7-Stimulationsversuche und für die Experimente mit multipler rhBMP7-Applikation auf.

Stimulationsmodus	Gen	rhBMP7-Konzentration	R ²	Prozentuale Effizienz
Singuläre rhBMP7-Stimulation	Actb	0 ng/ml	0,999	96,8%
		100 ng/ml	0,992	103,2%
		250 ng/ml	0,995	99,8%
		500 ng/ml	0,998	97,0%
	Hprt	0 ng/ml	0,995	114,4%
		100 ng/ml	0,993	125,5%
		250 ng/ml	0,995	114,4%
		500 ng/ml	0,994	130,2%
	Runx2	0 ng/ml	0,995	101,6%
		100 ng/ml	0,995	114,4%
		250 ng/ml	0,992	132,4%
		500 ng/ml	0,996	70,7%
	Alp1	0 ng/ml	0,996	110,8%
		100 ng/ml	0,991	157,1%
		250 ng/ml	0,990	121,0%
		500 ng/ml	0,995	118,9%
	Col1a1	0 ng/ml	0,999	96,1%
		100 ng/ml	0,994	107,0%
		250 ng/ml	0,995	95,3%
		500 ng/ml	1,000	103,7%
	Spp1	0 ng/ml	0,998	104,1%
		100 ng/ml	0,994	113,1%
		250 ng/ml	0,996	98,7%
		500 ng/ml	0,999	103,8%
	Bglap	0 ng/ml	0,991	99,1%
		100 ng/ml	0,994	145,7%
		250 ng/ml	0,993	93,9%
		500 ng/ml	0,995	136,9%
Multiple rhBMP7-Stimulation	Actb	0 ng/ml	0,993	96,6%
		100 ng/ml	0,991	101,7%
		250 ng/ml	0,994	94,5%
		500 ng/ml	0,990	95,9%
	Hprt	0 ng/ml	0,994	107,6%
		100 ng/ml	0,999	118,4%
		250 ng/ml	0,998	117,2%
		500 ng/ml	0,992	108,2%
	Runx2	0 ng/ml	0,990	172,5%
		100 ng/ml	0,992	148,9%

Stimulationsmodus	Gen	rhBMP7-Konzentration	R ²	Prozentuale Effizienz
		250 ng/ml	0,983	104,7%
		500 ng/ml	0,996	129,2%
	Alp1	0 ng/ml	0,993	129,4%
		100 ng/ml	0,995	124,9%
		250 ng/ml	0,994	111,8%
		500 ng/ml	0,996	93,2%
	Col1a1	0 ng/ml	0,996	87,8%
		100 ng/ml	0,994	107,1%
		250 ng/ml	0,997	99,6%
		500 ng/ml	0,998	93,3%
	Spp1	0 ng/ml	0,993	97,2%
		100 ng/ml	0,997	110,7%
		250 ng/ml	0,996	102,5%
		500 ng/ml	0,996	102,0%
	Bglap	0 ng/ml	0,995	130,7%
		100 ng/ml	0,993	103,0%
		250 ng/ml	0,998	125,4%
		500 ng/ml	0,995	103,8%

10.1.10 Ergebnisse der qRT-PCR in Rohformat

Die nachfolgenden Tabellen stellen die Ergebnisse sämtlicher in dieser Arbeit durchgeführter qRT-PCRs dar, wobei eine Normalisierung der Werte auf den Mittelwert der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml am Tag 3 durchgeführt wurde.

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,956039638	0,628167389	0,422305236	0,497505479	0,608249827
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,808155808	0,241921093	0,34276814	0,336122495	0,414560764
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	1,103923468	1,014413684	0,501842332	0,658888464	0,801938889
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	1,813929465	1,730155344	2,343923779	1,286362415	1,084208447
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,958992768	0,668221485	1,012430048	0,249808617	0,551005775
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	2,668866162	2,792089203	3,67541751	2,322916212	1,617411118
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,230030897	0,641677267	0,233770985	1,216132106	1,307541727
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,170458026	0,471832556	0,179263827	0,440328084	0,977908564

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	0,289603769	0,811521978	0,288278144	1,991936128	1,63717489
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	1,51168801	1,417078035	0,785968009	0,713721831	1,727761345
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	1,243122926	1,136246376	0,66577947	0,539426056	1,052234405
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	1,780253094	1,697909695	0,906156549	0,888017607	2,403288285
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	2,410575005	3,066721591	0,952174541	1,148802803	1,889859346
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	2,122440331	2,597933177	0,736250454	0,733294406	1,586236374
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	2,69870968	3,535510004	1,168098628	1,564311199	2,193482317
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	1,481209964	1,653798076	0,280243834	1,130701828	1,591793312
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	1,139917273	1,426178791	0,238338619	0,834435417	1,302427099
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	1,822502656	1,88141736	0,322149048	1,42696824	1,881159525
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,763592792	1,008393047	0,721207583	0,616036534	1,983351251
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,61738513	0,877838494	0,466633393	0,554578581	1,781368252
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,909800455	1,138947601	0,975781773	0,677494487	2,185334249
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,984350304	1,43763473	0,769016926	0,445263926	1,298965826
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,860362701	1,294283845	0,592201691	0,383652364	1,132382703
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	1,108337907	1,580985616	0,945832161	0,506875488	1,465548949
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	1,004998549	1,936182688	0,828872702	0,691979521	2,230918161
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,830420772	1,686752543	0,700495849	0,551119414	1,393996472
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	1,179576327	2,185612833	0,957249554	0,832839628	3,06783985
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	1,336290319	1,475662053	0,74149583	0,659332167	1,551165591
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,302712246	0,939920234	0,428232925	-0,070746255	0,899047487
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	2,369868392	2,011403872	1,054758735	1,389410588	2,203283695
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	1,139505998	1,173331996	0,562786748	0,871545327	1,226165019
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,94110911	0,826277073	0,485862162	0,724898388	0,848970786
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	1,337902886	1,52038692	0,639711334	1,018192267	1,603359252
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	1,411689927	1,304162277	1,043333847	0,807662637	2,697345575
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	1,069541983	0,968747516	0,755006502	0,612940653	2,01766262
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	1,753837872	1,639577039	1,331661192	1,002384621	3,377028531
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	1,089749301	4,677904157	11,04360044	0,579246744	1,913131116
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,935019928	2,959095019	9,378782419	0,4273301	1,500488103
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	1,244478675	6,396713295	12,70841847	0,731163388	2,325774129
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	1,970749847	7,435598082	32,2318481	1,749062228	8,694211158
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	1,161837625	2,98126428	16,95082687	1,105885034	5,697125523

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	2,77966207	11,88993189	47,51286932	2,392239423	11,69129679
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,765749806	4,064911187	17,9345083	0,718549894	4,038600328
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,55045056	2,357265907	15,17115561	0,402347019	3,254992799
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,981049051	5,772556467	20,69786099	1,034752769	4,822207857
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	3,292923596	9,541139847	36,85069794	0,884688366	12,36847777
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	2,715365819	6,818413592	28,13246929	0,751881018	9,534010769
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	3,870481373	12,2638661	45,5689266	1,017495714	15,20294477
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	3,430268724	6,890972794	21,26164274	0,967269138	12,04531149
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	2,425113611	5,081571558	15,79548226	0,849750267	10,35191287
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	4,435423837	8,700374031	26,72780322	1,084788009	13,73871011
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	1,85630212	5,387291357	14,00507907	1,291262329	8,555231173
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	1,293531464	4,313949611	12,78820798	1,065740174	4,75453666
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	2,419072776	6,460633104	15,22195017	1,516784484	12,35592569
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	1,36848481	6,010226691	20,57539844	1,085678433	4,692740581
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	1,116438278	4,200697688	16,75048213	0,793489397	3,743922958
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	1,620531341	7,819755694	24,40031475	1,377867469	5,641558205
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	0,400845164	1,396304384	3,389378774	0,346749611	3,820612194
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	0,331710962	1,130881435	2,231729219	0,252873112	3,018467686
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	0,469979365	1,661727332	4,547028329	0,44062611	4,622756701
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,993079334	5,418903642	14,94983653	0,766686453	11,33599791
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,612635711	4,350768751	11,39932006	0,513104404	9,132753722
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	1,373522958	6,487038533	18,500353	1,020268502	13,53924211
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	1,44868423	5,437190505	14,52731963	1,549868304	32,28886042
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,848646723	3,429532578	9,049249421	0,919484654	19,48147419
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	2,048721737	7,444848432	20,00538983	2,180251954	45,09624665
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	2,042171076	9,177715304	33,58621335	1,129761536	32,4139341
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	1,409722212	6,038054439	16,02794703	0,688745174	22,55947262
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	2,674619939	12,31737617	51,14447967	1,570777899	42,26839559
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,775586565	4,473716325	13,68318464	1,051067921	24,38992585
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,55565744	3,468254451	7,935302969	0,736687253	19,4974533
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,99551569	5,479178198	19,43106631	1,365448589	29,28239841
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,715576153	2,263949788	9,448446829	0,928297199	19,76658481
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,281403818	0,80749714	5,546375037	0,251996411	11,73141026

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	1,149748489	3,720402436	13,35051862	1,604597987	27,80175937
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0,656961075	3,960296548	9,254445105	2,804608487	28,87400991
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0,232053604	2,138447631	5,356143865	1,233033829	16,78418272
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	1,081868546	5,782145464	13,15274635	4,376183146	40,96383709
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,976949013	2,949142734	11,6730421	2,660725436	28,21084127
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,758537101	1,795636645	5,230551012	1,921386048	21,96756843
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	1,195360924	4,102648824	18,11553318	3,400064824	34,45411411
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	3,820950509	10,73510952	41,35379458	1,122768213	42,00223632
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	3,372450503	9,972932738	34,20614133	1,00989841	31,74446722
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	4,269450516	11,4972863	48,50144783	1,235638016	52,26000541
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	2,213859091	7,264922463	27,89962897	1,046432817	66,79140263
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	1,644270961	5,973711995	19,75844992	0,589322955	54,83584846
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	2,783447221	8,556132931	36,04080801	1,503542679	78,7469568
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	1,679285354	6,79331812	24,61811567	1,093032169	47,7413888
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	1,392973914	5,557287305	20,69769772	0,825341918	37,98940036
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	1,965596795	8,029348935	28,53853363	1,36072242	57,49337723
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,681040958	4,716894327	15,42257423	0,843575243	31,2725735
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,606805425	3,724113885	12,17749581	0,682430215	25,06314393
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	0,755276491	5,709674769	18,66765265	1,00472027	37,48200307
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0,823131792	5,859334991	14,26732621	1,09495966	46,89278831
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0,640982716	4,874790982	10,35468677	0,85764105	40,35656522
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	1,005280869	6,843879	18,17996565	1,33227827	53,42901139
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,427969928	5,765562998	8,632030594	1,079827322	256,3904995
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,379500482	5,377119712	4,069200028	0,956235931	223,6649329
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0,476439373	6,154006284	13,19486116	1,203418713	289,116066
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	1,870783655	8,640890144	22,21642322	0,796115713	26,59022911
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	1,480548431	7,422569532	18,58087294	0,660505636	20,16648474
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	2,26101888	9,859210756	25,8519735	0,93172579	33,01397348
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	1,020532576	15,59865216	41,07726046	1,554009346	81,5128838
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0,017997785	12,89766452	21,00627797	1,396076013	54,71250655
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	2,023067368	18,29963981	61,14824296	1,711942678	108,313261
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,499521667	10,42319119	41,81506629	1,044708175	132,9023078
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	-0,22113941	6,965257251	25,18040758	0,694800325	73,03729399
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	1,220182744	13,88112512	58,449725	1,394616025	192,7673217

Multiple rhBMP7- Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	1,143097201	1,13045573	0,639234975	0,868111201	1,084025334
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,871821628	0,964716141	0,540585006	0,815340887	0,792631233
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	1,414372774	1,29619532	0,737884944	0,920881515	1,375419435
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	1,023616661	0,840621513	1,079571114	1,183048531	0,856370978
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,817693974	0,697933313	0,881134077	0,90207326	0,576787395
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	1,229539349	0,983309714	1,278008152	1,464023803	1,135954562
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,833286138	1,028922756	1,281193911	0,948840268	1,059603688
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,551232751	0,962067031	0,905549263	0,849027133	0,749366691
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	1,115339525	1,095778482	1,656838558	1,048653402	1,369840684
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,696989308	1,002226642	0,730704773	0,353172286	0,289348508
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,466364136	0,747089646	0,625706858	0,307287402	0,189327899
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,927614481	1,257363638	0,835702688	0,399057171	0,389369116
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,523154954	0,658752493	0,918530267	0,529145224	0,51555175
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,398978233	0,500059348	0,704999928	0,427460275	0,371716008
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	0,647331674	0,817445639	1,132060605	0,630830173	0,659387493
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,491345435	0,699795043	0,592814507	0,503475843	0,616272077
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,365483496	0,467595203	0,392236262	0,389537879	0,471718139
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	0,617207373	0,931994883	0,793392752	0,617413808	0,760826014
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	1,289677961	0,37674218	1,389009847	0,554509179	0,907358571
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	1,041987269	0,312183999	1,211814333	0,355954965	0,727265642
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	1,537368654	0,441300361	1,566205362	0,753063393	1,0874515
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	1,574208218	0,639694521	2,743630402	0,911372086	2,928241995
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,329898964	0,137133192	0,565687151	0,171536842	0,624727458
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	2,818517472	1,14225585	4,921573654	1,65120733	5,231756531
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	1,095276843	0,290578363	4,943484543	0,410878516	2,050510445
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,804562339	0,240707898	3,269501829	0,334271705	1,783283673
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	1,385991346	0,340448827	6,617467256	0,487485327	2,317737217
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,541958772	0,317105999	1,962594688	0,403788998	2,653788598
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,483827327	0,26079709	1,507409482	0,370783828	2,227351751
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,600090216	0,373414907	2,417779894	0,436794167	3,080225446
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,54784391	0,361255492	1,241886135	0,451485618	1,167966814
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,474590431	0,32876122	1,166374431	0,363993623	0,961168271
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	0,62109739	0,393749764	1,31739784	0,538977613	1,374765357

Multiple rhBMP7- Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Bglap- Expression
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,715209273	0,43166256	3,306686556	0,496684466	1,822048356
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,607142967	0,369319164	3,077435554	0,4227143	1,542126147
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	0,823275579	0,494005956	3,535937559	0,570654632	2,101970564
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	0,82653896	1,487159386	3,344636983	1,08515796	37,75613193
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,732283568	1,31789944	2,918918909	0,921858023	34,21692947
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	0,920794351	1,656419332	3,770355058	1,248457898	41,29533438
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	1,349516398	2,623379269	4,954308536	1,952133818	23,49772682
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	0,929637595	2,139726567	3,117440887	1,532435792	19,1277253
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	1,7693952	3,107031971	6,791176184	2,371831844	27,86772833
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,612784372	1,275726219	3,136107054	2,010608537	43,44645296
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,485231613	1,129860796	2,621883259	1,951315911	41,34321758
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,740337132	1,421591642	3,650330849	2,069901163	45,54968834
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	0,215306604	0,525688228	3,063765702	0,900157403	74,06216546
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,164387279	0,455454465	2,061040785	0,734216803	67,93956779
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	0,266225929	0,595921992	4,066490619	1,066098002	80,18476313
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	0,202039081	0,520652189	2,334575277	0,620631712	40,23758781
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	0,16909877	0,477806971	1,690397269	0,457424454	37,61507013
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	0,234979391	0,563497408	2,978753285	0,783838971	42,86010548
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,843472693	1,176366943	2,094672971	1,001315006	11,94013806
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,756643486	1,030183528	1,908408773	0,915232626	11,03037477
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,9303019	1,322550358	2,280937169	1,087397385	12,84990135
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	1,104960537	0,527807658	6,65931071	0,908193374	42,33694563
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,972808901	0,49806712	6,091041167	0,863095754	40,28275764
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	1,237112173	0,557548197	7,227580252	0,953290995	44,39113362
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	1,52326473	0,890296109	13,64779854	1,378688791	32,92569135
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	0,086851184	0,072645575	1,175304911	0,10708418	2,822804708
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	2,959678275	1,707946642	26,12029217	2,650293401	63,028578
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,910104429	0,531716585	4,348160744	1,745112343	36,43070665
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,703854581	0,451339837	3,900715264	1,392238337	32,94669743
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	1,116354277	0,612093333	4,795606224	2,09798635	39,91471587
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	0,962448096	1,151036429	20,10247588	1,524976509	210,1999114
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,889479809	1,04489927	13,80297837	1,386958986	181,2938417
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	1,035416383	1,257173588	26,40197339	1,662994032	239,1059812

Multiple rhBMP7- Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Bglap- Expression
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	0,30977192	0,462032564	11,01841271	2,433637063	182,6596322
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	0,279925976	0,422439086	9,917346519	2,140210645	165,5658154
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	0,339617863	0,501626042	12,11947891	2,72706348	199,753449
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,424212399	1,064985778	13,19122467	1,123354628	124,225721
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,385213925	0,975224997	11,87758215	1,037109575	97,14034353
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,463210873	1,15474656	14,50486719	1,209599681	151,3110984
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,259737895	0,615419584	0,784782538	1,665577967	91,78680956
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,227703204	0,525177537	0,613969341	1,419402734	74,0508237
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	0,291772585	0,705661631	0,955595736	1,911753199	109,5227954
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0,435650997	1,23835878	3,05034471	1,298941557	184,347455
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0,366299421	1,049903888	2,482056615	1,134819235	142,7711667
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	0,505002573	1,426813672	3,618632805	1,463063879	225,9237432
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,837790604	1,133725396	2,397337397	1,709371329	30,72239155
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,54382219	0,770870411	1,530259688	1,159026671	20,94977097
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	1,131759019	1,496580381	3,264415106	2,259715987	40,49501212
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,515017755	0,926366973	3,506175796	1,236985702	30,46790522
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,382622933	0,826739588	3,168052665	1,075349857	28,52941213
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	0,647412577	1,025994358	3,844298927	1,398621548	32,40639831
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0,404763746	0,947178575	3,200981427	1,4164474	46,92099136
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0,320195237	0,841741931	2,314699502	1,213989334	41,60943044
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	0,489332255	1,052615219	4,087263353	1,618905465	52,23255229
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,364828049	1,156798271	3,456268207	0,923340259	65,51728489
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,311299906	1,022676374	2,727298793	0,803948496	58,73621417
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0,418356191	1,290920167	4,185237621	1,042732022	72,2983556
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,859694508	0,94325461	9,655176071	0,817523146	72,22778354
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,609652881	0,828816367	8,390399456	0,738665644	62,02465022
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	1,109736135	1,057692853	10,91995269	0,896380649	82,43091687
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0,334571796	0,699938169	3,929310189	0,528658411	113,4177057
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0,151899223	0,174037038	2,746590844	0,320157661	103,6501709
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	0,51724437	1,2258393	5,112029534	0,737159161	123,1852404
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,626003825	0,823183958	9,202064092	1,308611603	58,32262409
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,380379942	0,739802433	7,906888178	1,044770868	55,1740797
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0,871627707	0,906565483	10,49724001	1,572452339	61,47116848

Multiple rhBMP7- Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Osteoblasten- Bereich Bglap- Expression
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,732169453	1,600751574	20,33498194	1,149218089	317,4772662
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,592614493	1,360875248	16,88583105	0,978679948	260,9818516
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	0,871724412	1,840627901	23,78413283	1,319756231	373,9726808
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0,435309018	0,981451333	17,29599499	1,220793258	407,4769272
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0,358059742	0,831675267	15,30393975	0,94212887	353,8666936
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	0,512558293	1,1312274	19,28805023	1,499457646	461,0871608
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	1,216711594	0,955865816	27,05132812	2,485714729	404,4607177
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,909582782	0,834841231	22,37442271	2,207465505	352,412412
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	1,523840406	1,0768904	31,72823354	2,763963953	456,5090234

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Interface-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	2,00926564	1,89943956	1,486942018	1,945155553	0,786241362
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	1,511185143	1,506939487	0,679901239	1,344775452	0,421949233
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	2,507346136	2,291939633	2,293982797	2,545535654	1,150533491
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,398225778	0,587864937	1,002065099	0,286981249	0,881036706
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,195345111	0,473108293	0,806816658	0,214614651	0,79544558
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	0,601106444	0,702621581	1,197313541	0,359347847	0,966627831
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,592508583	0,512695503	0,510992883	0,767863198	1,332721932
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,425041288	0,381880561	0,343884241	0,553919018	0,981505222
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	0,759975878	0,643510444	0,678101525	0,981807378	1,683938642
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	1,085984476	0,460012805	0,530912515	0,996103177	1,561736498
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,951442859	0,380900484	0,253634994	0,766057351	1,388267237
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	1,220526093	0,539125127	0,808190037	1,226149002	1,73520576
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	3,950018603	1,651101081	1,024609507	2,261094365	1,998924186
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	3,064894809	1,193126701	0,786813302	1,705171909	1,801245427
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	4,835142398	2,109075461	1,262405712	2,817016821	2,196602944
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	1,524205893	0,712820654	0,47008205	1,511826666	1,147067805
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	1,359621449	0,594816919	0,349926269	1,271177141	0,969666763
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	1,688790337	0,830824388	0,590237831	1,752476191	1,324468846

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Interface-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Bglap- Expression
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,527893185	0,392302577	0,245130504	0,649859744	0,956769011
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,481127539	0,354893501	0,125868257	0,573976312	0,82163627
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,574658831	0,429711653	0,364392752	0,725743176	1,091901752
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,49007979	0,370177636	0,778759684	0,222099062	1,072688006
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,362837637	0,293650212	0,592980191	0,165833061	0,833855593
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	0,617321943	0,44670506	0,964539176	0,278365063	1,31152042
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,700619722	0,509690885	0,906017138	1,244903813	1,842101946
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,566613873	0,412209323	0,413052675	1,007238897	1,289408357
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	0,834625571	0,607172446	1,398981601	1,48256873	2,394795536
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,604200197	0,307438243	0,537409782	0,561701986	2,715318263
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,581176092	0,239543771	0,399473838	0,512242474	2,406599603
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,627224302	0,375332714	0,675345725	0,611161498	3,024036922
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	1,297818609	0,774205589	0,627688421	1,418272067	1,197978514
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,926868049	0,573259654	0,29747603	1,036924567	0,819988562
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	1,668769168	0,975151524	0,957900812	1,799619566	1,575968467
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,090842558	0,376076758	1,160581304	0,848384881	2,478087016
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	-0,100345098	0,330235084	0,988930491	0,731390313	2,2042977
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	0,282030215	0,421918432	1,332232117	0,96537945	2,751876333
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	1,550686409	2,702747801	12,81958187	0,925853822	2,378090233
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	1,253077323	1,963753562	9,591299179	0,500447165	1,763383798
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	1,848295494	3,44174204	16,04786457	1,351260479	2,992796668
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	0,869293802	2,258520621	20,88182601	1,582932875	3,021752541
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	-0,095099427	0,923914593	8,493450757	0,091436179	1,214705858
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	1,833687031	3,593126649	33,27020126	3,074429572	4,828799224
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,245366484	0,680717137	3,494593497	0,229592801	1,108368135
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,189543431	0,508329069	2,685461391	0,132471628	0,819662693
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,301189537	0,853105205	4,303725603	0,326713974	1,397073577
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	3,086563278	3,111501043	40,48449716	0,61774285	4,000701497
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	2,756537366	2,461789114	31,08311375	0,38253664	3,236047721
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	3,41658919	3,761212971	49,88588057	0,85294906	4,765355273
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	2,523238108	3,398563666	24,69226774	0,817330387	4,287279746
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	1,961116469	2,803257588	18,36650038	0,671305082	3,154115942
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	3,085359748	3,993869743	31,0180351	0,963355692	5,42044355

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Interface-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Bglap- Expression
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,829601649	1,13453217	3,740695106	0,673971667	4,600679131
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,639736111	0,929665074	2,954860489	0,571105987	4,013669015
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	1,019467187	1,339399265	4,526529724	0,776837346	5,187689248
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	1,596997728	2,49873142	36,12890404	0,639201204	3,807812618
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	1,317698768	2,140510862	21,02049384	0,438025877	3,118407938
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	1,876296687	2,856951978	51,23731423	0,84037653	4,497217297
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	1,480807084	3,06833157	29,92394549	1,062456795	2,602489462
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	1,268951031	2,39554036	19,93294895	0,829355003	2,014082801
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	1,692663136	3,741122779	39,91494203	1,295558588	3,190896123
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,684420916	1,317813267	12,16451309	0,555636419	3,10888546
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,587753031	1,13113849	9,045316675	0,468110202	2,592842453
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,781088801	1,504488045	15,2837095	0,643162636	3,624928467
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	0,925966945	2,554628198	21,51375617	0,891560201	13,57364464
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,747378938	2,177696006	10,99943183	0,574549441	9,219006712
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	1,104554952	2,93156039	32,02808051	1,208570962	17,92828257
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	0,921177213	1,535524712	27,08357141	0,743750006	6,831670041
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	0,610415856	0,996585992	17,47767256	0,433512754	3,957393002
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	1,23193857	2,074463432	36,68947026	1,053987259	9,70594708
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,019177158	2,099294902	22,00492344	0,489589666	8,94163481
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,012949268	1,5268277	8,343456391	0,366998313	6,180565058
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,025405048	2,671762105	35,66639049	0,612181019	11,70270456
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	1,552867703	3,107421209	29,55492706	0,790490819	13,49377469
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	1,030421411	1,579721212	22,13418182	0,597484343	9,12351378
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	2,075313996	4,635121207	36,9756723	0,983497295	17,8640356
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	1,071296412	1,991544412	13,34787553	0,942681913	19,83331041
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0,845740473	1,110678055	10,18320521	0,728024644	13,60190542
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	1,296852351	2,87241077	16,51254585	1,157339182	26,0647154
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	1,25476206	3,914450973	12,99929751	0,514376572	3,949411304
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,915048407	2,777927809	5,396775147	0,261164442	2,412489888
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	1,594475713	5,050974137	20,60181987	0,767588703	5,486332719
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	2,833451282	5,226157164	35,1023324	0,928860256	30,36649673
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	2,246373869	3,343077406	27,2612935	0,747309844	23,99325273
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	3,420528694	7,109236922	42,9433713	1,110410668	36,73974074

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Interface-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Bglap- Expression
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	2,590240179	3,129405732	18,08272623	0,995426667	69,40826566
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	1,81428215	2,552728936	15,15364294	0,652695638	52,82369309
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	3,366198207	3,706082529	21,01180953	1,338157696	85,99283823
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	2,811209057	5,061423665	39,68121641	0,846946491	55,19421164
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	2,052220417	4,050979756	31,02094826	0,6020776	39,75249897
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	3,570197698	6,071867573	48,34148456	1,091815381	70,6359243
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	1,74505369	4,093872799	30,64736396	0,757485674	33,03418679
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	1,394138798	3,658129516	19,14709874	0,600913229	25,52608776
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	2,095968582	4,529616082	42,14762917	0,914058118	40,54228581
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0,743868072	2,471927063	19,8827988	1,040203784	48,5954585
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0,609403447	1,930281667	13,87977274	0,873556065	34,6835189
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	0,878332698	3,013572459	25,88582486	1,206851504	62,5073981
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,994706405	2,058036284	14,91969132	1,003446689	9,876426022
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,815499584	1,727219754	12,20554475	0,907507601	8,005145039
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	1,173913226	2,388852814	17,63383789	1,099385777	11,747707
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,0465591	1,88659423	17,42974659	0,852192211	20,61906693
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	-0,032235046	1,072412399	10,3341667	0,578557389	15,43455503
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	0,125353245	2,700776061	24,52532648	1,125827034	25,80357883
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0,084043755	0,931516962	5,936362844	0,298307483	9,414362907
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	-0,025375202	0,623691861	4,108245848	0,205902	6,584756089
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	0,193462712	1,239342063	7,76447984	0,390712967	12,24396972
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,135562822	2,024362091	8,463541848	0,349204821	66,30388769
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	-0,096045489	1,782069113	3,031072446	0,240349435	46,24154786
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0,367171134	2,266655068	13,89601125	0,458060208	86,36622753

Multiple rhBMP7- Stimulation im Interface-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	1,12480627	1,172111486	0,898546616	1,165200817	0,919261756
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,6375104	0,990723827	0,652452995	1,01522346	0,736919382

Multiple rhBMP7- Stimulation im Interface-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	1,61210214	1,353499146	1,144640237	1,315178175	1,10160413
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,948809464	0,735698203	0,87008818	1,111638603	0,907344197
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,555473049	0,47250015	0,603859684	0,681829324	0,536435141
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	1,342145878	0,998896257	1,136316677	1,541447881	1,278253252
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,926384266	1,09219031	1,231365204	0,72316058	1,173394048
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,684121562	0,803827502	0,747054946	0,55610406	0,799482468
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	1,16864697	1,380553119	1,715675463	0,8902171	1,547305628
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,655659372	0,973720396	0,478687077	1,425470918	0,786788816
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,402927361	0,893527144	0,329624744	1,247964803	0,614985368
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,908391382	1,053913648	0,627749409	1,602977033	0,958592265
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	1,063058301	1,309827568	1,181732506	1,134642582	1,041259876
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,800278286	1,128846382	0,711083302	1,017397915	0,935370453
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	1,325838317	1,490808754	1,65238171	1,251887249	1,1471493
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	1,936244228	1,408593253	0,778426656	1,165595843	0,632221576
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	1,706451698	1,168185843	0,489328272	1,004452898	0,560314041
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	2,166036757	1,649000663	1,06752504	1,326738788	0,704129111
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	2,698498774	1,388771023	4,049281502	0,714586929	1,451379862
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	2,242921776	1,179389435	3,198487837	0,589598882	1,010152125
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	3,154075773	1,598152611	4,900075167	0,839574975	1,892607598
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	1,945842905	0,794349546	4,139368194	0,707873352	1,744043558
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	1,402757807	0,686451184	3,996495922	0,529270508	1,484864675
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	2,488928003	0,902247908	4,282240465	0,886476196	2,003222441
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,14669554	0,57627933	6,748829698	0,903850724	3,550931913
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	-0,078082629	0,493488606	5,395686575	0,79925567	3,123726988
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	0,371473709	0,659070054	8,101972821	1,008445778	3,978136838
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,679686803	0,794155382	3,545454413	0,595200238	1,499241865
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,58891329	0,693880912	3,190894211	0,496780423	1,277357363
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,770460317	0,894429851	3,900014615	0,693620053	1,721126368
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,838278957	0,952256061	2,343240075	0,884114233	1,385179711
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,566901642	0,766718057	1,864607622	0,723931363	1,135215669
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	1,109656272	1,137794066	2,821872528	1,044297102	1,635143753
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	1,43791377	0,900564305	3,162602182	0,540545899	0,974992775
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	1,361022712	0,83093206	2,701248914	0,456837856	0,878013374
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	1,514804829	0,97019655	3,623955451	0,624253942	1,071972177

Multiple rhBMP7- Stimulation im Interface-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	1,208036713	1,013947601	3,277853136	1,681047892	3,898506587
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	-0,046090432	0,656096965	2,086908135	1,220180197	2,723598971
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	2,462163859	1,371798237	4,468798138	2,141915586	5,073414204
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	2,24465554	1,176112386	3,683305263	2,363306632	52,10612913
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	1,488416057	0,983530886	3,095039642	2,034257117	41,49332336
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	3,000895024	1,368693885	4,271570884	2,692356148	62,71893491
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	1,625270051	1,138843665	1,301010809	1,444304815	3,422433564
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,879837883	0,834730567	0,798318942	1,052158209	2,363374816
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	2,37070222	1,442956763	1,803702675	1,836451421	4,481492312
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	0,044999225	0,239665951	0,557265059	0,779392042	4,442754797
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,039764098	0,208347336	0,523350277	0,745335524	3,754122713
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	0,050234352	0,270984567	0,591179841	0,813448559	5,131386881
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	0,436689536	0,723473691	2,203407041	0,650939723	3,646268061
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	0,375119874	0,594896827	1,810853781	0,569158607	3,202582012
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	0,498259199	0,852050555	2,595960301	0,732720838	4,08995411
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	1,137910844	1,014757576	2,342049847	1,227861345	68,20877009
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	1,017278005	0,867237849	2,179622237	1,151533301	56,66243725
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	1,258543683	1,162277304	2,504477457	1,30418939	79,75510293
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	0,616326632	0,411490654	4,953533808	0,830777635	33,35500906
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,514215716	0,385423855	4,178084061	0,544739146	31,40866644
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	0,718437548	0,437557453	5,728983556	1,116816124	35,30135168
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	1,388756412	0,832821271	10,05184664	1,032475831	29,28436847
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	1,199088925	0,673393423	8,774047207	0,911339703	25,90261811
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	1,5784239	0,992249119	11,32964607	1,153611959	32,66611883
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,004223343	0,705138931	9,783116607	2,470532116	31,23755978
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,000301051	0,595152273	9,260524633	2,205727415	28,4846339
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,008145635	0,815125589	10,30570858	2,735336818	33,99048566
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	0,505251901	0,899350578	10,51661279	1,550415251	53,98665893
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,460381699	0,834942018	8,392634134	1,417523658	49,33812081
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	0,550122104	0,963759139	12,64059144	1,683306844	58,63519706
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	1,444136738	2,075440224	18,14558633	1,544009909	56,70213236
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	1,19469045	1,938615216	17,65863484	1,512108185	51,16691923
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	1,693583025	2,212265231	18,63253782	1,575911633	62,23734549

Multiple rhBMP7- Stimulation im Interface-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Bglap- Expression
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,168604024	0,306849405	1,357974309	1,894244756	38,48708701
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,146861821	0,276943486	1,129552796	1,657525457	35,70726583
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,190346228	0,336755324	1,586395821	2,130964055	41,26690819
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	1,03314719	1,066878453	0,76327971	1,970320235	35,59551887
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,9245645	0,980992025	0,637233301	1,622468797	32,66348025
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	1,141729879	1,152764882	0,889326119	2,318171674	38,52755749
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	1,316773814	1,33671474	1,330061335	3,129251464	12,04196656
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	1,195599892	1,206617388	1,190173708	2,738745592	10,14657954
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	1,437947736	1,466812093	1,469948963	3,519757336	13,93735358
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,188567613	0,366208493	0,108289065	0,933593609	6,64911105
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,164162799	0,316392751	0,045893905	0,810316233	5,791318045
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0,212972426	0,416024236	0,170684224	1,056870986	7,506904055
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,249571036	0,877558906	0,8393205	1,805520187	11,30004608
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,135393292	0,809924158	0,662033963	1,624291313	10,56808269
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	0,36374878	0,945193655	1,016607038	1,986749062	12,03200947
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0	0	0	0	0
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0	0	0	0	0
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	0	0	0	0	0
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,413731788	0,64220409	0,972378557	1,756404523	6,918015475
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,357036877	0,528004427	0,792214906	1,657887323	5,882553061
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0,470426699	0,756403753	1,152542207	1,854921724	7,953477889
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0	0	0	0	0
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0	0	0	0	0
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	0	0	0	0	0
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0,02461716	0,478584454	2,607401603	1,311031004	12,05114156
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	-0,025574992	0,405513361	2,322829511	0,939173203	10,67021125
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	0,074809311	0,551655546	2,891973695	1,682888806	13,43207188
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,019459749	0,450162217	2,71034022	0,756912965	3,363696217
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	-0,030858665	0,402556926	2,404611129	0,609476342	3,149440367
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0,069778162	0,497767507	3,01606931	0,904349587	3,577952068
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,132712513	0,233104171	0,767505229	1,233683586	13,20799746
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,113998714	0,223598874	0,711091265	1,153629816	12,40232766
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	0,151426312	0,242609468	0,823919193	1,313737355	14,01366727

Multiple rhBMP7- Stimulation im Interface-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Interface- Bereich Bglap- Expression
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0,234016993	0,526026661	3,473466239	1,501348583	14,3170615
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0,130749235	0,432399221	2,718476724	1,12591939	8,261499703
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	0,337284751	0,619654101	4,228455753	1,876777775	20,3726233
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,263174153	0,40202721	4,301277591	1,775362766	205,2885849
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,236899712	0,354125143	3,194047948	1,674328456	176,0755469
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0,289448594	0,449929276	5,408507234	1,876397075	234,5016228

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	1,016367065	0,934228425	1,070143284	0,72264184	0,741074808
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,227594019	0,458812872	0,524741726	0,368694036	0,367938902
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	1,805140112	1,409643979	1,615544841	1,076589644	1,114210714
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	1,478285292	1,58561916	1,704744537	1,636060517	1,487886425
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,882721514	1,089960689	1,161962603	1,013166225	1,069858848
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	2,073849069	2,081277631	2,24752647	2,25895481	1,905914001
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,505347643	0,480152415	0,22511218	0,641297643	0,771038767
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,360266694	0,196540281	-0,087185858	0,442656431	0,543706011
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	0,650428592	0,763764548	0,537410217	0,839938855	0,998371524
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	1,00611149	0,71572782	0,935911761	0,385598037	1,809308257
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,724838468	0,549936381	0,462754008	0,30987003	1,18944516
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	1,287384513	0,881519259	1,409069515	0,461326043	2,429171355
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,580823121	0,249119497	0,511056339	0,773061436	1,352252244
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,305797392	0,201829454	0,310506875	0,587803788	0,85733456
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	0,855848851	0,296409539	0,711605803	0,958319084	1,847169928
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,965766562	0,389445451	0,611332672	0,701883346	2,326883565
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,77404817	0,299229051	0,424366768	0,552590892	1,732656296
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	1,157484954	0,479661851	0,798298577	0,8511758	2,921110835
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,35756808	0,468273818	0,651654583	0,31139729	1,103446421
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,31414793	0,359116047	0,340036778	0,265546012	0,838461981

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Bglap- Expression
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,400988229	0,577431588	0,963272388	0,357248568	1,368430862
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,610695708	0,448225809	0,629092539	0,505686135	0,856058439
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,497498177	0,363213546	0,488651614	0,422782718	0,726224068
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	0,723893238	0,533238071	0,769533464	0,588589551	0,985892809
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	4,049720406	1,049771972	3,979282556	0,526830537	0,823162989
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	3,655174017	0,900174903	2,466303291	0,381472781	0,555802203
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	4,444266794	1,199369042	5,492261821	0,672188294	1,090523776
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,643485305	0,406878359	2,802603912	0,359899965	0,501769314
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,554131625	0,344175322	2,466017106	0,319203282	0,350717581
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,732838984	0,469581395	3,139190718	0,400596647	0,652821047
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,947068695	1,009893517	4,459560411	0,352014894	0,718894234
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,667092951	0,848440743	3,280985936	0,278850885	0,511531578
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	1,22704444	1,171346291	5,638134887	0,425178902	0,92625689
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	6,380839588	1,02403508	4,347112565	1,026191442	0,781378098
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	5,815918055	0,932213191	1,351442194	0,912300998	0,43781793
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	6,94576112	1,11585697	7,342782935	1,140081886	1,124938267
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	3,550841145	3,619725689	9,324643574	1,263503234	3,140124084
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	1,257452963	2,156995988	6,095117425	0,297477563	2,437866832
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	5,844229326	5,082455389	12,55416972	2,229528905	3,842381337
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	3,032523606	2,36167405	4,566743746	3,279691527	3,80138115
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	2,203383227	1,717033082	4,348242868	2,878942112	3,262558836
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	3,861663986	3,006315017	4,785244624	3,680440943	4,340203464
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,264465104	0,993213792	0,110990924	0,889673418	1,511699831
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,234966021	0,877215208	0,089920188	0,778954834	1,324336294
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,293964187	1,109212377	0,13206166	1,000392003	1,699063369
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	2,031818894	0,832996337	1,226319054	1,070575412	7,714091598
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,719215998	0,764725068	0,883126158	0,894102002	5,42398365
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	3,34442179	0,901267605	1,56951195	1,247048823	10,00419955
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	12,18273283	12,3026949	16,72055434	3,855974657	17,29106539
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	-1,137535422	-0,916436666	-2,658325158	-0,264278847	-1,083365895
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	25,50300108	25,52182647	36,09943383	7,97622816	35,66549667
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	1,123530721	4,879552216	1,151887838	1,607755799	8,00003112
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	1,045151654	4,259489723	0,920090564	0,719991496	7,271971306
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	1,201909789	5,499614708	1,383685113	2,495520102	8,728090934

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Bglap- Expression
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	14,0874434	5,834395497	76,9414604	2,087834384	5,198663218
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	12,51378238	4,988568788	66,01267376	1,670087579	4,195433035
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	15,66110441	6,680222205	87,87024703	2,505581189	6,201893402
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	9,535001989	3,983350365	24,48604736	1,739901612	4,369936248
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	7,940671989	3,20809912	19,98947538	1,375375848	3,667210722
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	11,12933199	4,75860161	28,98261935	2,104427375	5,072661774
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	2,366309564	1,33521834	2,270637172	0,29610527	2,336295894
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	1,77308197	1,043054973	1,805735934	0,227651129	1,501974219
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	2,959537158	1,627381707	2,735538409	0,364559411	3,17061757
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	6,86648746	3,596808454	10,28510004	1,287885822	5,340535111
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	4,433654109	2,739917898	-1,77137311	0,965439653	3,521868086
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	9,299320812	4,45369901	22,34157319	1,610331991	7,159202136
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	10,99776805	3,032137357	24,69513051	8,635953131	16,57817851
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	8,068884655	2,426208253	18,34732109	7,045660599	10,63177632
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	13,92665145	3,63806646	31,04293993	10,22624566	22,52458071
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	28,71439683	6,382191396	59,67161781	3,630853646	5,749387075
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	21,30854784	4,967987298	34,64487682	2,464274	4,660875908
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	36,12024582	7,796395494	84,69835881	4,797433292	6,837898243
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	2,967794038	3,162579858	4,657865962	1,808362754	9,361623679
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	1,805922954	2,629056528	3,510612316	1,330519323	7,912325146
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	4,129665121	3,696103187	5,805119607	2,286206185	10,81092221
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	14,45910156	6,167193925	17,32048432	6,908136942	15,95144241
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	8,804111536	4,127081067	11,03865596	4,15857064	12,43637229
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	20,11409158	8,207306783	23,60231268	9,657703243	19,46651253
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	4,455831288	3,929985766	7,81549138	1,80618505	17,55769751
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	3,146678662	2,100410949	6,606722514	1,346369794	14,70408382
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	5,764983913	5,759560583	9,024260247	2,266000305	20,41131121
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	18,09768023	5,986615048	13,73645365	4,337649011	43,70269232
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	12,16674977	5,097126977	10,92022543	2,812447234	23,05425534
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	24,02861069	6,876103118	16,55268187	5,862850789	64,3511293
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	33,14686499	7,31466696	42,81900857	7,089846794	31,84641631
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	27,67747833	6,148649972	32,36472571	5,98148302	24,17139449
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	38,61625164	8,480683949	53,27329143	8,198210569	39,52143814

Singuläre rhBMP7- Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Runx2- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Col1a1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Alp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Spp1- Expression	Singuläre rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Bglap- Expression
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	24,63805693	7,734536505	27,75642634	1,632811599	22,37749606
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	15,92202578	6,730773477	23,00814269	0,618299199	18,4967868
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	33,35408809	8,738299534	32,50471	2,647323999	26,25820532
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	10,85904609	3,382724915	9,999716265	3,155220148	15,29499614
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	9,765121938	2,618357306	8,9193586	2,713130957	12,65858456
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	11,95297024	4,147092525	11,08007393	3,597309339	17,93140771
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	42,35348557	8,659213793	94,66650677	4,581424824	26,16447699
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	37,73800643	7,361743151	50,71997948	3,939489912	20,57209641
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	46,96896471	9,956684436	138,6130341	5,223359737	31,75685757
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	3,619386845	1,782609778	6,779330363	1,473284695	5,259625423
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	2,825414808	1,276091273	3,589326663	1,378176501	4,477480795
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	4,413358881	2,289128283	9,969334064	1,56839289	6,04177005
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,801408691	6,619433652	3,712769116	0,734501143	42,29082676
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	-0,117212836	3,519273551	2,271911697	0,493303874	26,61311503
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	1,720030218	9,719593753	5,153626536	0,975698412	57,96853849
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	2,984835891	5,142052646	23,2458205	5,408386824	35,71852714
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	-0,490770553	3,639314484	17,01509574	3,91821794	21,30486854
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	6,460442335	6,644790808	29,47654526	6,898555708	50,13218573
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,127020659	1,192027123	0,651941716	0,319264046	20,57987558
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,113534787	0,911582859	0,445402642	0,256139946	13,19539276
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0,14050653	1,472471387	0,85848079	0,382388145	27,96435839

Multiple rhBMP7- Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,876841705	0,867395931	0,952595643	1,201000837	1,374935259
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,843314762	0,787923365	0,692976204	1,171466245	1,107039896
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,910368648	0,946868497	1,212215082	1,230535429	1,642830622
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	1,186046622	1,058190217	0,982894583	1,000846264	0,803588628
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,228688054	0,842670632	0,669799257	0,718286767	0,637487176

Multiple rhBMP7- Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	2,14340519	1,273709803	1,295989909	1,28340576	0,969690081
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,937111673	1,074413851	1,064509775	0,798152899	0,821476113
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,427195879	0,797643944	0,867703713	0,596720907	0,608912482
0 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	1,447027467	1,351183759	1,261315836	0,999584891	1,034039744
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,172434886	0,478601446	0,387565345	0,329906932	0,340098188
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,140490246	0,411994633	0,29940099	0,27121815	0,302705848
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,204379527	0,54520826	0,4757297	0,388595714	0,377490529
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,259920822	0,598928385	0,365155284	0,339134247	0,413142254
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,181847428	0,553539299	0,250819976	0,306128348	0,338367146
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	0,337994216	0,644317471	0,479490592	0,372140146	0,487917362
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,342449352	1,357467345	0,36868938	0,385192371	0,576764296
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,223832824	1,257237652	0,31490805	0,338713605	0,551306051
100 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	0,46106588	1,457697037	0,42247071	0,431671138	0,602222541
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	1,972447914	0,72753573	1,719860321	0,362113058	0,374568433
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	1,621020524	0,518729147	1,479196383	0,32443098	0,285817625
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	2,323875304	0,936342314	1,960524259	0,399795136	0,463319241
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,426735377	0,55815306	0,991285041	0,286699066	0,357024282
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,369697368	0,390774071	0,756273628	0,214117967	0,255619462
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	0,483773387	0,725532049	1,226296454	0,359280165	0,458429102
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,293892701	0,634049846	1,11797147	0,215405397	0,257201886
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,155846398	0,376798543	0,74371203	0,137144775	0,16472754
250 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	0,431939004	0,891301148	1,492230911	0,293666019	0,349676232
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 1	0,176187487	0,850633692	1,006232284	0,169220406	0,31931845
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 2	0,123231527	0,793109837	0,846794683	0,139946026	0,280009855
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 3	0,229143447	0,908157548	1,165669886	0,198494786	0,358627046
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 4	0,211676128	0,637820986	1,277695628	0,279169719	0,460889309
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 5	0,156106698	0,546557437	0,876704413	0,240411846	0,395411677
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 6	0,267245558	0,729084535	1,678686844	0,317927593	0,526366941
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 7	0,743189411	0,768247736	1,841520483	0,314676454	0,410526759
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 8	0,39454879	0,7244428	1,559152807	0,285009285	0,30540003
500 ng/ml - Tag 3 - Wert 9	1,091830031	0,812052672	2,12388816	0,344343624	0,515653489
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	0,308131017	2,606033547	0,221286722	1,18806633	3,298974689
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,252945258	2,154527018	0,163777462	0,928079635	2,596124204

Multiple rhBMP7- Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	0,363316777	3,057540076	0,278795983	1,448053026	4,001825173
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	0,136034894	1,528777205	0,372050936	1,081488188	3,632139512
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	-0,021116614	1,258617835	0,259871704	0,892700049	2,805626278
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	0,293186403	1,798936574	0,484230168	1,270276327	4,458652745
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,129640391	1,457908122	0,357148918	1,168490399	3,463519914
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	-0,051931131	1,293445354	0,255279034	1,046817811	3,140151174
0 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,311211914	1,622370891	0,459018802	1,290162988	3,786888655
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	0,222560049	1,413449007	0,371461609	0,465282397	1,759355315
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,126118993	1,201830568	0,288463866	0,400701324	1,513729055
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	0,319001105	1,625067446	0,454459352	0,52986347	2,004981575
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	0,176452519	0,978233956	0,17588873	0,581441966	2,749827736
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	0,125459966	0,857235604	0,107618021	0,503888103	2,47058342
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	0,227445072	1,099232308	0,244159439	0,65899583	3,029072052
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	0,400763904	3,034036681	1,657248651	0,85767299	3,79079499
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	0,146769777	2,489388848	0,629943566	-0,077025563	3,077323208
100 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	0,654758031	3,578684513	2,684553735	1,792371542	4,504266772
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	0,807020338	0,725679643	1,185192236	0,396477649	4,267133408
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	0,557098557	0,686427128	0,975061335	0,293516485	4,004531637
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	1,056942119	0,764932158	1,395323137	0,499438814	4,529735178
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	8,324327094	1,586786316	9,53083042	4,035849324	9,239507024
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	3,426776531	1,184899049	7,037238263	2,410711742	6,942831916
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	13,22187766	1,988673582	12,02442258	5,660986906	11,53618213
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	3,05115651	1,273535331	3,917465301	0,807828115	3,432651081
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	2,472866517	1,108850444	3,422721147	0,628687314	3,12525628
250 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	3,629446502	1,438220217	4,412209455	0,986968916	3,740045883
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 1	2,18570695	1,072392405	5,506792756	1,992730488	10,07603048
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 2	1,699777814	0,922534617	4,942589533	1,751810028	8,652613668
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 3	2,671636085	1,222250193	6,07099598	2,233650949	11,49944729
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 4	4,387331863	1,35566906	10,85089801	3,594091396	9,470953681
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 5	3,360082574	1,230297733	9,718814598	3,155505199	8,316134096
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 6	5,414581152	1,481040386	11,98298142	4,032677593	10,62577327
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 7	2,835833019	0,743948151	4,231747599	1,400230471	2,079777838
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 8	2,373034846	0,541332979	3,576626154	1,19220138	1,290070192
500 ng/ml - Tag 7 - Wert 9	3,298631191	0,946563322	4,886869044	1,608259563	2,869485485

Multiple rhBMP7- Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Bglap- Expression
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	7,379938952	4,157340974	1,821547481	6,748168985	22,49094308
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	5,795902814	3,779929506	1,326660714	6,177799292	20,34538907
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	8,963975091	4,534752441	2,316434247	7,318538678	24,6364971
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	2,452538554	2,917376632	1,647141743	2,974775749	7,981371603
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	1,876815054	2,533317852	1,151137422	2,455965844	7,097503957
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	3,028262055	3,301435412	2,143146065	3,493585654	8,86523925
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0,266598266	1,515336258	0,166686952	0,680728532	2,91748625
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,060507649	0,682889365	0,021051152	0,306937032	1,291650466
0 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0,472688882	2,347783151	0,312322751	1,054520032	4,543322034
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,721195179	1,896701824	1,365240392	1,286787749	66,1145957
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,587837128	1,718497151	0,83605649	1,12388142	60,12239678
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	0,85455323	2,074906497	1,894424293	1,449694078	72,10679462
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0	0	0	0	0
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0	0	0	0	0
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	0	0	0	0	0
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	1,197259795	1,503553936	0,679582322	0,679687527	9,773683994
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0,26511712	1,413497646	0,302290502	-0,050463614	8,599200812
100 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	2,129402469	1,593610225	1,056874143	1,409838669	10,94816718
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,809673759	1,105959352	5,497581609	1,348678149	2,473351178
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,09129408	0,955388112	4,537903141	1,211701754	2,275840075
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	1,528053438	1,256530593	6,457260076	1,485654545	2,670862282
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0,75568356	0,824886032	6,499229158	1,451665048	7,019026475
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	-0,386956349	0,686629331	4,871098043	1,08780248	6,281960434
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	1,898323468	0,963142734	8,127360273	1,815527617	7,756092516
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0	0	0	0	0
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0	0	0	0	0
250 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0	0	0	0	0
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 1	0,337477273	0,511936635	2,059367399	0,763401937	36,2102935
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 2	0,077527127	0,484323886	1,432189913	0,729950375	34,23553313
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 3	0,597427419	0,539549384	2,686544885	0,796853498	38,18505388
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 4	0	0	0	0	0
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 5	0	0	0	0	0
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 6	0	0	0	0	0

Multiple rhBMP7- Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Probe (Alle Werte (Wert 1-9) sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (0 ng/ml - Tag 3))	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Runx2- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Col1a1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Alp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Spp1- Expression	Multiple rhBMP7- Stimulation Fibroblasten- Bereich Bglap- Expression
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 7	0	0,434795771	0	0,53668045	164,175569
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 8	0	0,386037089	0	0,473770444	145,6780367
500 ng/ml - Tag 10 - Wert 9	0	0,483554453	0	0,599590457	182,6731013

10.1.11 Ergebnisse der Signifikanz-Analyse der bereichsabhängigen qRT-PCRs

Die nachfolgenden Tabellen stellen die berechneten Signifikanzen für die bereichsabhängigen qRT-PCR-Ergebnisse samt ihren Signifikanz-Niveaus dar.

Singuläre rhBMP7-Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,102	0,917	1	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	1	1	1	0,557	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,961	1	1	0,979	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,976	0	0	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,996	0,257	0,199	0	0,671
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0	0,353	0,973	1	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,89	0,883	0,417	0,903	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	1	0,946	1	0,973	0,662
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,595	0,146	0,109	0	0,831
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0	0	0,001	0,585
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1	0,129	0,998	0	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,901	0	0	0,002	0,016
Summe	2	3	3	5	2

Multiple rhBMP7-Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap

Multiple rhBMP7-Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,159	0,769	1	0,081	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	0,467	0,007	0,771	0,403	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,224	0,002	0,991	0,071	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0	0,404	0,012	0,207
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,077	1	0,995	0,064	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,059	0	0,979	0,001	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,745	0	0,045	0,523	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,316	0	0	1	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,18	0	0,887	0,998	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	1	1	0,979	0,431	0,006
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1	0,911	0,006	0,014	0,741
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,609	0,882	0	1	0
Summe	0	7	4	3	5

Singuläre rhBMP7-Stimulation im Interface-Bereich					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,005	1	1	0,089	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	0,786	0,764	1	0,787	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,935	0,855	1	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0,286	0,088	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,972	0	0,001	0,899	0,259
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,003	0,609	0,135	0,964	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,896	0,956	0,023	0,995	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,986	1	0,101	0,97	0,72
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,83	0,089	0,697	0,994	0,376
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0,011	0,053	0,99	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1	1	0,994	0,985	0,014
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,005	0,018	0,404	0,902	0,005
Summe	4	3	2	0	3

Multiple rhBMP7-Stimulation im Interface-Bereich					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,988	0,745	1	0,954	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	0,223	1	0,008	0,971	1

Multiple rhBMP7-Stimulation im Interface-Bereich					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	1	0,996	0,445	0,784	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,107	0,998	0,612	0,014	0,778
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,999	1	1	0,001	0,854
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,001	0,078	0,965	0,003	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,004	0,068	0	0,616	0,987
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,006	1	0	0,997	0,261
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,026	0,903	0,444	0,994	1
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,182	0,123	1	0,015	0,982
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,031	0,005	0,968	0	0,97
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,168	0,021	0,39	0,293	0,001
Summe	5	2	3	5	1

Singuläre rhBMP7-Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	1	1	1	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	1	1	1	0,998	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	1	1	1	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0,952	1	0,969	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,427	0,111	0,952	0,054	0,003
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,986	0,071	1	1	0,168
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,411	0,936	0,016	1	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,003	0,662	0,04	0,03	0,42
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,692	0,616	0,999	0,363	0,017
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0,364	0,321	0,959	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,013	1	0,037	1	1
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,486	1	1	0,63	0
Summe	3	3	3	1	4

Multiple rhBMP7-Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,948	0,997	0,992	0,771	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	1	0,813	1	0,679	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,984	0,977	1	0,627	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,915	0,031	0,985	1	1

Multiple rhBMP7-Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,022	0	1	0	0,966
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	1	1	1	0,927	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0	0,159	0	0,835	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,002	0,052	0	0,136	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,001	0,008	0,914	0	0,996
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,005	0	0,998	0	0,796
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,003	0	0,012	0	0,994
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0	0	0,998	0	0
Summe	7	6	3	5	1

10.1.12 Ergebnisse der Signifikanz-Analyse der zeitabhängigen qRT-PCRs

Die nachfolgenden Tabellen stellen die berechneten Signifikanzen für die zeitabhängigen qRT-PCR-Ergebnisse samt ihren Signifikanz-Niveaus dar.

Singuläre rhBMP7-Stimulation an Tag 3					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,102	0,917	1	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	1	1	1	0,557	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,961	1	1	0,979	1
Summe	0	0	0	0	0
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,005	1	1	0,089	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	0,786	0,764	1	0,787	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,935	0,855	1	1	1
Summe	1	0	0	0	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	1	1	1	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	1	1	1	0,998	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	1	1	1	1	1

Singuläre rhBMP7-Stimulation an Tag 3					
Summe	0	0	0	0	0

Multiple rhBMP7-Stimulation - Tag 3					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,159	0,769	1	0,081	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	0,467	0,007	0,771	0,403	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,224	0,002	0,991	0,071	1
Summe	0	2	0	0	0
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,988	0,745	1	0,954	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	0,223	1	0,008	0,971	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	1	0,996	0,445	0,784	1
Summe	0	0	1	0	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,948	0,997	0,992	0,771	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	1	0,813	1	0,679	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,984	0,977	1	0,627	1
Summe	0	0	0	0	0

Singuläre rhBMP7-Stimulation an Tag 7					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0	0,353	0,973	1	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,89	0,883	0,417	0,903	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	1	0,946	1	0,973	0,662
Summe	1	0	0	0	0
Interface					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,003	0,609	0,135	0,964	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,896	0,956	0,023	0,995	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,986	1	0,101	0,97	0,72

Singuläre rhBMP7-Stimulation an Tag 7					
Summe	1	0	1	0	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,986	0,071	1	1	0,168
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,411	0,936	0,016	1	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,003	0,662	0,04	0,03	0,42
Summe	1	0	2	1	0

Multiple rhBMP7-Stimulation - Tag 7					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,059	0	0,979	0,001	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,745	0	0,045	0,523	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,316	0	0	1	0
Summe	0	3	2	1	0
Interface					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,001	0,078	0,965	0,003	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,004	0,068	0	0,616	0,987
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,006	1	0	0,997	0,261
Summe	3	0	2	1	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	1	1	1	0,927	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0	0,159	0	0,835	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,002	0,052	0	0,136	1
Summe	2	0	2	0	0

Singuläre rhBMP7-Stimulation an Tag 10					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0	0	0,001	0,585
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1	0,129	0,998	0	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,901	0	0	0,002	0,016
Summe	1	2	2	3	2

Singuläre rhBMP7-Stimulation an Tag 10					
Interface					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0,011	0,053	0,99	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1	1	0,994	0,985	0,014
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,005	0,018	0,404	0,902	0,005
Summe	2	2	0	0	3
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0,364	0,321	0,959	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,013	1	0,037	1	1
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,486	1	1	0,63	0
Summe	2	0	1	0	2

Multiple rhBMP7-Stimulation - Tag 10					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	1	1	0,979	0,431	0,006
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1	0,911	0,006	0,014	0,741
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,609	0,882	0	1	0
Summe	0	0	2	1	2
Interface					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,182	0,123	1	0,015	0,982
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,031	0,005	0,968	0	0,97
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,168	0,021	0,39	0,293	0,001
Summe	1	2	0	2	1
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,005	0	0,998	0	0,796
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,003	0	0,012	0	0,994
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0	0	0,998	0	0
Summe	3	3	1	3	1

10.1.13 Ergebnisse der Signifikanz-Analyse der dosisabhängigen qRT-PCRs

Die nachfolgenden Tabellen stellen die berechneten Signifikanzen für die dosisabhängigen qRT-PCR-Ergebnisse samt ihren Signifikanz-Niveaus dar.

Singuläre rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,102	0,917	1	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,976	0	0	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7	0	0	0	1	0,999
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,996	0,257	0,199	0	0,671
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0	0	1	0,029
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0	0,353	0,973	1	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,595	0,146	0,109	0	0,831
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,001	0,039	0,077	1	0,054
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0	0	0,001	0,585
Summe	5	5	4	3	1
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,005	1	1	0,089	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0,286	0,088	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,008	0,006	0	0,779	0,999
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,972	0	0,001	0,899	0,259
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0	0	1	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,003	0,609	0,135	0,964	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,83	0,089	0,697	0,994	0,376
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0	0,001	1	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0,011	0,053	0,99	0
Summe	6	5	4	0	3
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	1	1	1	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0,952	1	0,969	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,863	0,005	0,999	0,773	0,051
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,427	0,111	0,952	0,054	0,003
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0	0,038	0,003	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,986	0,071	1	1	0,168
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,692	0,616	0,999	0,363	0,017

Singuläre rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0,009	0,101	0,048	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0,364	0,321	0,959	0
Summe	3	3	1	2	5

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,159	0,769	1	0,081	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0	0,404	0,012	0,207
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,021	0,559	0,95	0,989	0,074
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,077	1	0,995	0,064	0
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,024	1	0,598	0,96	0,029
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,059	0	0,979	0,001	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,18	0	0,887	0,998	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,065	0	1	0,138	0,983
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	1	1	0,979	0,431	0,006
Summe	2	4	0	2	4
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,988	0,745	1	0,954	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,107	0,998	0,612	0,014	0,778
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,514	0,302	0,998	1	0,492
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,999	1	1	0,001	0,854
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,05	0,041	1	0,992	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,001	0,078	0,965	0,003	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,026	0,903	0,444	0,994	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10	0	0,006	0,37	0,097	0,956
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,182	0,123	1	0,015	0,982
Summe	3	2	0	4	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,948	0,997	0,992	0,771	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,915	0,031	0,985	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,952	0,051	1	0,992	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,022	0	1	0	0,966
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10	1	1	1	0,995	0,209
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	1	1	1	0,927	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,001	0,008	0,914	0	0,996
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,999	0,099	1	0,943	0,317

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,005	0	0,998	0	0,796
Summe	3	4	0	3	0

Singuläre rhBMP7-Stimulation mit 250 ng/ml					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	1	1	1	0,557	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,976	0	0	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7	1	0,012	0,04	0,929	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,996	0,257	0,199	0	0,671
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,888	0	0,045	1	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,89	0,883	0,417	0,903	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,595	0,146	0,109	0	0,831
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,304	1	0,386	1	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1	0,129	0,998	0	0
Summe	0	3	3	3	3
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	0,786	0,764	1	0,787	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0,286	0,088	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,99	0,033	0	0,906	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,972	0	0,001	0,899	0,259
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10	1	0	0	1	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,896	0,956	0,023	0,995	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,83	0,089	0,697	0,994	0,376
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,983	0,173	0,231	1	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1	1	0,994	0,985	0,014
Summe	0	3	4	0	3
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	1	1	1	0,998	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0,952	1	0,969	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,215	0,312	0,005	1	0,982
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,427	0,111	0,952	0,054	0,003
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10	0	0,081	0,002	0,166	0,001
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,411	0,936	0,016	1	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,692	0,616	0,999	0,363	0,017
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10	0	0,515	0,007	0,708	0,006
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,013	1	0,037	1	1

Singuläre rhBMP7-Stimulation mit 250 ng/ml					
Summe	3	0	5	0	4

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 250 ng/ml					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	0,467	0,007	0,771	0,403	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0	0,404	0,012	0,207
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,95	0,22	0	0,505	0,152
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,077	1	0,995	0,064	0
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,237	0,899	0,001	0,999	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,745	0	0,045	0,523	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,18	0	0,887	0,998	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,455	0	0,12	0,002	0,03
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1	0,911	0,006	0,014	0,741
Summe	0	5	4	3	4
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	0,223	1	0,008	0,971	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,107	0,998	0,612	0,014	0,778
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,849	0,273	0	0,445	0,249
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,999	1	1	0,001	0,854
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,006	0,001	0,996	0,826	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,004	0,068	0	0,616	0,987
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,026	0,903	0,444	0,994	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10	0	0	0,978	0	0,934
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,031	0,005	0,968	0	0,97
Summe	5	3	3	4	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3	1	0	0,404	0,012	0,207
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,915	0,031	0,985	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,001	0,996	0	0,626	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,022	0	1	0	0,966
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,998	0,821	0,006	1	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0	0,159	0	0,835	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,001	0,008	0,914	0	0,996
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10	1	0,001	0	1	1
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,003	0	0,012	0	0,994

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 250 ng/ml					
Summe	5	6	5	4	0

Singuläre rhBMP7-Stimulation mit 500 ng/ml					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,961	1	1	0,979	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,976	0	0	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,759	0	0	0,959	0,493
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,996	0,257	0,199	0	0,671
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10	1	0	0	1	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	1	0,946	1	0,973	0,662
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,595	0,146	0,109	0	0,831
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10	1	0	0,006	1	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,901	0	0	0,002	0,016
Summe	0	5	5	3	3
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,935	0,855	1	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0,286	0,088	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,877	0,123	0	0,795	0,561
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,972	0	0,001	0,899	0,259
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,058	0,701	0,212	0,208	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,986	1	0,101	0,97	0,72
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,83	0,089	0,697	0,994	0,376
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,129	0,998	1	0,412	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,005	0,018	0,404	0,902	0,005
Summe	1	2	2	0	3
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	1	1	1	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0,952	1	0,969	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,001	0,127	0,013	0,002	0,164
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,427	0,111	0,952	0,054	0,003
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10	1	0,131	0,972	0,791	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,003	0,662	0,04	0,03	0,42
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,692	0,616	0,999	0,363	0,017
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10	1	0,672	1	1	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,486	1	1	0,63	0
Summe	2	0	2	2	5

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 500 ng/ml					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,224	0,002	0,991	0,071	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	1	0	0,404	0,012	0,207
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,15	0,997	0	0,01	0
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,077	1	0,995	0,064	0
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,894	0,895	0	0,03	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,316	0	0	1	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,18	0	0,887	0,998	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,993	0,003	0	1	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,609	0,882	0	1	0
Summe	0	5	5	3	7
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	1	0,996	0,445	0,784	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,107	0,998	0,612	0,014	0,778
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,916	0,999	0	0,08	0,01
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,999	1	1	0,001	0,854
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,045	0,005	0,551	0,302	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,006	1	0	0,997	0,261
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,026	0,903	0,444	0,994	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10	0	0,001	1	0,786	0,001
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,168	0,021	0,39	0,293	0,001
Summe	4	3	2	2	4
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3	0,984	0,977	1	0,627	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7	0,915	0,031	0,985	1	1
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,051	1	0	0,069	0,999
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,022	0	1	0	0,966
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,863	0,142	1	0,875	0
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,002	0,052	0	0,136	1
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,001	0,008	0,914	0	0,996
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10	1	0	1	0,678	0
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	0	0	0,998	0	0
Summe	4	5	2	3	3

10.1.14 Ergebnisse der Genexpressionslevel-Analyse für die bereichsabhängigen qRT-PCRs

Die nachfolgenden Tabellen stellen die Expressionslevel der untersuchten Gene dar, wobei lediglich diejenigen Werte aufgeführt sind, die in den bereichsabhängigen qRT-PCR-Ergebnissen statistische Signifikanzen aufwiesen.

Singuläre rhBMP7-Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,67 vs. 4,68	0,422 vs. 16,95		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10				0,66 vs. 1,92	
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	1,09 vs. 2,72				
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10				0,73 vs. 1,92	
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,76 vs. 2,21	2,95 vs. 8,03	9,45 vs. 28,54	1,92 vs. 1,02	
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10				1,92 vs. 1,00	27,80 vs. 46,89
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10		2,95 vs. 10,42	9,45 vs. 25,85	1,92 vs. 1,04	27,80 vs. 73,04
Summe	2	3	3	5	2

Multiple rhBMP7-Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml an Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3		0,98 vs. 0,34			
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3		0,98 vs. 0,37			
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,98 vs. 1,49		0,92 vs. 1,95	
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10					1,06 vs. 91,79

Multiple rhBMP7-Stimulation im Osteoblasten-Bereich					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7		1,49 vs. 0,56		1,95 vs. 0,90	
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7		1,49 vs. 0,53	3,34 vs. 6,09		
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7		1,49 vs. 1,04	3,34 vs. 13,19		37,76 vs. 181,29
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10		1,49 vs. 1,05			37,76 vs. 91,79
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10					91,79 vs. 46,92
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10			2,40 vs. 8,39	1,46 vs. 0,82	
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10			2,40 vs. 20,33		91,79 vs. 373,97
Summe	0	7	4	3	5

Singuläre rhBMP7-Stimulation im Interface-Bereich					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,60 vs. 1,52				
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10		0,64 vs. 2,87	0,81 vs. 16,51		
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,87 vs. 2,52				
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7			9,59 vs. 21,02		
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	1,25 vs. 2,81	2,87 vs. 4,05			13,49 vs. 52,82
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10					13,49 vs. 33,03
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	1,25 vs. 0,08	2,87 vs. 1,78			13,49 vs. 20,62
Summe	4	3	2	0	3

Multiple rhBMP7-Stimulation im Interface-Bereich					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap

Multiple rhBMP7-Stimulation im Interface-Bereich					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3			0,90 vs. 4,28		
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7				1,02 vs. 1,84	
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10				1,02 vs. 1,97	
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	1,63 vs. 0,44			1,84 vs. 0,78	
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	1,63 vs. 0,62		3,10 vs. 9,26		
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	1,63 vs. 0,51		3,10 vs. 10,52		
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	1,63 vs. 1,03				
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10				1,97 vs. 1,78	
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1,03 vs. 0,02	1,07 vs. 0,46		1,97 vs. 0,92	
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10		1,07 vs. 0,40			12,04 vs. 14,31
Summe	5	2	3	5	1

Singuläre rhBMP7-Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10					1,00 vs. 14,70
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7			4,57 vs. 24,49		
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	2,20 vs. 11,00		4,57 vs. 24,70	1,26 vs. 3,63	
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10					3,14 vs. 14,70
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	4,46 vs. 24,64				14,70 vs. 26,26
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	4,46 vs. 10,86		7,82 vs. 10,00		
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10					14,70 vs. 27,96
Summe	3	3	3	1	4

Multiple rhBMP7-Stimulation im Fibroblasten-Bereich					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,95 vs. 1,62			
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,91 vs. 2,45	0,95 vs. 2,92		1,00 vs. 2,97	
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,25 vs. 3,05		0,28 vs. 3,92		
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,25 vs. 2,84		0,28 vs. 5,51		
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,25 vs. 2,45	1,62 vs. 2,92		1,17 vs. 2,97	
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	2,45 vs. 0,79	2,92 vs. 1,66		2,97 vs. 1,21	
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	2,45 vs. 0,78	2,92 vs. 0,96	1,33 vs. 5,98	2,97 vs. 1,40	
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	2,45 vs. 0,34	2,92 vs. 0,48		2,97 vs. 0,66	7,98 vs. 91,93
Summe	7	6	3	5	1

10.1.15 Ergebnisse der Genexpressionslevel-Analyse für die zeitabhängigen qRT-PCRs

Die nachfolgenden Tabellen stellen die Expressionslevel der untersuchten Gene dar, wobei lediglich diejenigen Werte aufgeführt sind, die in den zeitabhängigen qRT-PCR-Ergebnissen statistische Signifikanzen aufwiesen.

Singuläre rhBMP7-Stimulation an Tag 3					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel- orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3					

Singuläre rhBMP7-Stimulation an Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
Summe	0	0	0	0	0
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,60 vs. 1,52				
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
Summe	1	0	0	0	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
Summe	0	0	0	0	0

Multiple rhBMP7-Stimulation - Tag 3					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel- orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3		0,98 vs. 0,34			
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3		0,98 vs. 0,37			
Summe	0	2	0	0	0
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3			0,90 vs. 4,28		
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
Summe	0	0	1	0	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					

Multiple rhBMP7-Stimulation - Tag 3					
Summe	0	0	0	0	0

Singuläre rhBMP7-Stimulation an Tag 7					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	1,09 vs. 2,72				
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7					
Summe	1	0	0	0	0
Interface					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,87 vs. 2,52				
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7			9,59 vs. 21,02		
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7					
Summe	1	0	1	0	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7			4,57 vs. 24,49		
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	2,20 vs. 11,00		4,57 vs. 24,70	1,26 vs. 3,63	
Summe	1	0	2	1	0

Multiple rhBMP7-Stimulation - Tag 7					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7		1,49 vs. 0,56		1,95 vs. 0,90	
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7		1,49 vs. 0,53	3,34 vs. 6,09		
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7		1,49 vs. 1,04	3,34 vs. 13,19		37,76 vs. 181,29

Multiple rhBMP7-Stimulation - Tag 7					
Summe	0	3	2	1	0
Interface					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	1,63 vs. 0,44			1,84 vs. 0,78	
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	1,63 vs. 0,62		3,10 vs. 9,26		
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	1,63 vs. 0,51		3,10 vs. 10,52		
Summe	3	0	2	1	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,25 vs. 3,05		0,28 vs. 3,92		
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,25 vs. 2,84		0,28 vs. 5,51		
Summe	2	0	2	0	0

Singuläre rhBMP7-Stimulation an Tag 10					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel- orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,76 vs. 2,21	2,95 vs. 8,03	9,45 vs. 28,54	1,92 vs. 1,09	
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10				1,92 vs. 1,00	27,80 vs. 46,89
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10		2,95 vs. 10,42	9,45 vs. 25,85	1,92 vs. 1,04	27,80 vs. 73,04
Summe	1	2	2	3	2
Interface					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	1,25 vs. 2,81	2,87 vs. 4,05			13,49 vs. 52,82
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10					13,49 vs. 33,03
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	1,25 vs. 0,08	2,87 vs. 1,78			13,49 vs. 20,62
Summe	2	2	0	0	3
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	4,46 vs. 24,64				14,70 vs. 26,26
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	4,46 vs. 10,86		7,82 vs. 10,00		
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10					14,70 vs. 27,94
Summe	2	0	1	0	2

Multiple rhBMP7-Stimulation - Tag 10					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10					91,79 vs. 46,92
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10			2,40 vs. 8,39	1,46 vs. 0,82	
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10			2,40 vs. 20,33		91,79 vs. 373,97
Summe	0	0	2	1	2
Interface					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10				1,97 vs. 1,78	
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1,03 vs. 0,02	1,07 vs. 0,46		1,97 vs. 0,92	
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10		1,07 vs. 0,4			12,04 vs. 14,32
Summe	1	2	0	2	1
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	2,45 vs. 0,79	2,92 vs. 1,66		2,97 vs. 1,21	
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	2,45 vs. 0,78	2,92 vs. 0,96	1,33 vs. 5,98	2,97 vs. 1,40	
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	2,45 vs. 0,34	2,92 vs. 0,48		2,97 vs. 0,66	7,98 vs. 91,93
Summe	3	3	1	3	1

10.1.16 Ergebnisse der Genexpressionslevel-Analyse für die dosisabhängigen qRT-PCRs

Die nachfolgenden Tabellen stellen die Expressionslevel der untersuchten Gene dar, wobei lediglich diejenigen Werte aufgeführt sind, die in den dosisabhängigen qRT-PCR-Ergebnissen statistische Signifikanzen aufwiesen.

Singuläre rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap

Singuläre rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml					
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,67 vs. 4,68	0,42 vs. 16,95		
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,96 vs. 2,72	0,67 vs. 6,82	0,42 vs. 21,26		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10				0,66 vs. 1,92	
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,96 vs. 2,21	0,67 vs. 8,03	0,42 vs. 28,54		0,98 vs. 52,26
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	1,09 vs. 2,72				
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10				0,73 vs. 1,92	
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10	1,09 vs. 2,21	4,68 vs. 8,03			
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,76 vs. 2,21	2,95 vs. 8,03	9,45 vs. 28,54	1,92 vs. 1,09	
Summe	5	5	4	3	1
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3	0,60 vs. 1,52				
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,60 vs. 2,52	0,64 vs. 2,80	0,81 vs. 24,69		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10		0,64 vs. 2,87	0,81 vs. 16,51		
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,60 vs. 2,81	0,64 vs. 4,05	0,81 vs. 31,02		0,97 vs. 52,82
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	0,87 vs. 2,52				
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,87 vs. 2,81	1,96 vs. 4,05	9,59 vs. 31,02		1,76 vs. 52,82
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	1,25 vs. 2,81	2,87 vs. 4,05			13,49 vs. 52,82
Summe	6	5	4	0	3
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7		0,93 vs. 4,26			
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10					1,00 vs. 14,70
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10	0,88 vs. 24,64	0,93 vs. 6,88	1,07 vs. 27,76	0,84 vs. 4,34	1,00 vs. 26,26
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10					3,14 vs. 14,70
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10	2,20 vs. 24,64	2,16 vs. 6,88		1,26 vs. 4,34	3,14 vs. 26,26
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	4,46 vs. 24,64				14,70 vs. 26,26
Summe	3	3	1	2	5

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 100 ng/ml					
Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)					
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,98 vs. 1,49		0,92 vs. 1,95	
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7	1,02 vs. 0,23				
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10					1,06 vs. 91,79
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10	1,02 vs. 0,40				1,06 vs. 46,92
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7		1,49 vs. 0,56		1,95 vs. 0,90	
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10		1,49 vs. 1,05			37,76 vs. 91,79
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10		1,49 vs. 1,02			
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10					91,79 vs. 46,92
Summe	2	4	0	2	4
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7				1,02 vs. 1,84	
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10				1,02 vs. 1,97	
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10		1,00 vs. 0,78			
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7	1,63 vs. 0,44			1,84 vs. 0,78	
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	1,63 vs. 1,03				
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10	1,63 vs. 0,36	1,14 vs. 0,78			
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10				1,97 vs. 1,78	
Summe	3	2	0	4	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,95 vs. 1,62			
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,91 vs. 2,45	0,95 vs. 2,92		1,00 vs. 2,97	
0 ng/ml Tag 3 vs. 100 ng/ml Tag 10					
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,25 vs. 2,45	1,62 vs. 2,92		1,17 vs. 2,97	
0 ng/ml Tag 7 vs. 100 ng/ml Tag 10					
0 ng/ml Tag 10 vs. 100 ng/ml Tag 10	2,45 vs. 0,79	2,92 vs. 1,66		2,97 vs. 1,21	
Summe	3	4	0	3	0

Singuläre rhBMP7-Stimulation mit 250 ng/ml					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell- orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,67 vs. 4,68	0,42 vs. 16,95		
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7		0,67 vs. 4,35	0,42 vs. 14,95		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10				0,66 vs. 1,92	
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10		0,67 vs. 5,71	0,42 vs. 13,19		0,98 vs. 46,89
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10				0,73 vs. 1,92	
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10					4,04 vs. 46,89
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10				1,92 vs. 1,00	27,80 vs. 46,89
Summe	0	3	3	3	3
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7		0,64 vs. 2,40	0,81 vs. 21,02		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10		0,64 vs. 2,87	0,81 vs. 16,51		
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10		0,64 vs. 2,47	0,81 vs. 19,15		0,97 vs. 33,03
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7			9,59 vs. 21,02		
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10					
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10					1,76 vs. 33,03
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10					13,49 vs. 33,03
Summe	0	3	4	0	3
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7			1,07 vs. 24,49		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10					1,00 vs. 14,70
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,88 vs. 10,86		1,07 vs. 10,00		1,00 vs. 15,29
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7			4,57 vs. 24,49		
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10					3,14 vs. 14,70
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10	2,20 vs. 10,86		4,57 vs. 10,00		3,14 vs. 15,29
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	4,46 vs. 10,86		7,82 vs. 10,00		

Singuläre rhBMP7-Stimulation mit 250 ng/ml					
Summe	3	0	5	0	4

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 250 ng/ml					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3		0,98 vs. 0,34			
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,98 vs. 1,49		0,92 vs. 1,95	
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7			0,91 vs. 6,09		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10					1,06 vs. 91,79
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10			0,91 vs. 8,39		1,06 vs. 72,23
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7		1,49 vs. 0,53	3,34 vs. 6,09		
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10		1,49 vs. 1,05			37,76 vs. 91,79
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10		1,49 vs. 0,83		1,95 vs. 1,21	37,76 vs. 72,23
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10			2,40 vs. 8,39	1,46 vs. 1,21	
Summe	0	5	4	3	4
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3			0,90 vs. 4,28		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7				1,02 vs. 1,84	
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7			0,90 vs. 9,26		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10				1,02 vs. 1,97	
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10	0,95 vs. 0,02	1,00 vs. 0,46			
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	1,63 vs. 0,62		3,10 vs. 9,26		
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	1,63 vs. 1,03				
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10	1,63 vs. 0,02	1,14 vs. 0,46		1,84 vs. 0,92	
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	1,03 vs. 0,02	1,07 vs. 0,46		1,97 vs. 0,92	
Summe	5	3	3	4	0
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 3		0,95 vs. 0,63		1,00 vs. 0,29	
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,95 vs. 1,62			
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,91 vs. 3,05		0,98 vs. 3,92		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,91 vs. 2,45	0,95 vs. 2,92		1,00 vs. 1,92	
0 ng/ml Tag 3 vs. 250 ng/ml Tag 10			0,98 vs. 5,98		
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 7	0,25 vs. 3,05		0,28 vs. 3,92		
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	0,25 vs. 2,45	1,62 vs. 2,92		1,17 vs. 2,97	

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 250 ng/ml					
0 ng/ml Tag 7 vs. 250 ng/ml Tag 10		1,62 vs. 0,96	0,28 vs. 5,98		
0 ng/ml Tag 10 vs. 250 ng/ml Tag 10	2,45 vs. 0,78	2,92 vs. 0,96	1,33 vs. 5,98	2,97 vs. 1,40	
Summe	5	6	5	4	0

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 500 ng/ml					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3		0,98 vs. 0,37			
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,98 vs. 1,49		0,92 vs. 1,95	
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7			0,91 vs. 13,19	0,92 vs. 1,52	1,06 vs. 181,29
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10					1,06 vs. 91,79
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10			0,91 vs. 20,33	0,92 vs. 1,32	1,06 vs. 373,97
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7		1,49 vs. 1,04	3,34 vs. 13,19		37,56 vs. 181,29
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10		1,49 vs. 1,05			37,56 vs. 91,79
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10		1,49 vs. 1,08	3,34 vs. 20,33		37,56 vs. 373,97
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10			2,40 vs. 20,33		91,79 vs. 373,97
Summe	0	5	5	3	7
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7				1,02 vs. 1,84	
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7			0,90 vs. 10,52		0,92 vs. 51,17
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10				1,02 vs. 1,97	
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,95 vs. 0,23	1,00 vs. 0,40			0,92 vs. 14,32
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	1,63 vs. 0,51		3,10 vs. 10,52		
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	1,63 vs. 1,03				
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10	1,63 vs. 0,23	1,14 vs. 0,40			4,48 vs. 14,32
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10		1,07 vs. 0,40			12,04 vs. 14,32
Summe	4	3	2	2	4

Singuläre rhBMP7-Stimulation mit 500 ng/ml					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap

Singuläre rhBMP7-Stimulation mit 500 ng/ml					
orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)					
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,67 vs. 4,68	0,42 vs. 16,95		
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7		0,67 vs. 5,48	0,42 vs. 16,03		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10				0,66 vs. 1,92	
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10		0,67 vs. 10,42	0,42 vs. 25,85		0,98 vs. 73,04
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10				0,73 vs. 1,92	
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10		4,68 vs. 10,42	16,95 vs. 25,85		4,04 vs. 73,04
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10		2,95 vs. 10,42	9,45 vs. 25,85	1,92 vs. 1,04	27,80 vs. 73,04
Summe	0	5	5	3	3
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7			0,81 vs. 22,00		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10		0,64 vs. 2,87	0,81 vs. 16,51		
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10					0,97 vs. 20,62
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10					
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10					1,76 vs. 20,62
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	1,25 vs. 0,08	3,91 vs. 2,02			13,49 vs. 20,62
Summe	1	2	2	0	3
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7	0,88 vs. 11,00		1,07 vs. 24,70	0,84 vs. 3,63	
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10					1,00 vs. 14,70
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10					1,00 vs. 27,96
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	2,20 vs. 11,00		4,57 vs. 24,70	1,26 vs. 3,63	
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10					3,14 vs. 14,70
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10					3,14 vs. 27,96
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10					14,70 vs. 27,96
Summe	2	0	2	2	5

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 500 ng/ml					
Genexpressionslevel mit Normalisierung auf die Kontrolle 0 ng/ml am Tag 3 Statistische Signifikanzen (hell-orange p < 0,05; orange p < 0,01; dunkel-orange p < 0,001)	Runx2	Col1a1	Alp1	Spp1	Bglap
Osteoblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3		0,98 vs. 0,37			
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7		0,98 vs. 1,49		0,92 vs. 1,95	
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7			0,91 vs. 13,19	0,92 vs. 1,52	1,06 vs. 181,29
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10					1,06 vs. 91,79
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10			0,91 vs. 20,33	0,92 vs. 1,32	1,06 vs. 373,97
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7		1,49 vs. 1,04	3,34 vs. 13,19		37,56 vs. 181,29
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10		1,49 vs. 1,05			37,56 vs. 91,79
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10		1,49 vs. 1,08	3,34 vs. 20,33		37,56 vs. 373,97
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10			2,40 vs. 20,33		91,79 vs. 373,97
Summe	0	5	5	3	7
Interface					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7				1,02 vs. 1,84	
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7			0,90 vs. 3,19		0,92 vs. 51,17
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10				1,02 vs. 1,97	
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10	0,95 vs. 0,23	1,00 vs. 0,40			0,92 vs. 14,32
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7	1,63 vs. 0,51		3,10 vs. 10,52		
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10	1,63 vs. 1,03				
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10	1,63 vs. 0,23	1,14 vs. 0,40			4,48 vs. 14,32
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10		1,07 vs. 0,40			12,04 vs. 14,32
Summe	4	3	2	2	4
Fibroblasten					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 3					
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 7					
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 7			0,98 vs. 5,51		
0 ng/ml Tag 3 vs. 0 ng/ml Tag 10		0,95 vs. 2,92		1,00 vs. 2,97	
0 ng/ml Tag 3 vs. 500 ng/ml Tag 10					0,97 vs. 91,93
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 7			0,28 vs. 5,51		
0 ng/ml Tag 7 vs. 0 ng/ml Tag 10				1,17 vs. 2,97	
0 ng/ml Tag 7 vs. 500 ng/ml Tag 10		1,62 vs. 0,48			3,46 vs. 91,93
0 ng/ml Tag 10 vs. 500 ng/ml Tag 10	2,45 vs. 0,34	2,92 vs. 0,48		2,97 vs. 0,66	7,98 vs. 91,93

Multiple rhBMP7-Stimulation mit 500 ng/ml					
Summe	4	5	2	3	3

10.2 Protokolle

10.2.1 Protokoll zur Herstellung von Osteoblasten-Medium

Das nachfolgende Protokoll dokumentiert die Herstellung des Kultivierungs-Mediums für die osteoblastische MC3T3-E1-Zelllinie.

Vorbereitung / Materialien

1. 1x Flasche 500 ml Gibco Minimal Essential Medium Alpha Modification bereitstellen, nachfolgend als α MEM bezeichnet
2. 50 ml Biochrom FBS Superior 10% fetales Rinderserum (fetal bovine serum) bereitstellen, nachfolgend als FBS bezeichnet
3. 5 ml Gibco L-Glutamin 200 mM bereitstellen, nachfolgend als L-Glutamin bezeichnet
4. 5 ml Gibco Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml 100x (enthält 10.000 U/ml Penicillin und 10.000 μ g/ml Streptomycin) bereitstellen, nachfolgend als PenStrep bezeichnet

Durchführung

1. 60 ml α MEM verwerfen
2. 50 ml des FBS hinzufügen und durch Auf- und Abpipettieren vermischen
3. 5 ml L-Glutamin hinzugeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischen
4. 5 ml PenStrep hinzufügen und durch Auf- und Abpipettieren vermischen

Das Osteoblasten-Medium mit einem Volumen von 500 ml enthält anschließend 10% FBS, 1% L-Glutamin sowie 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin.

10.2.2 Protokoll zur Herstellung von Fibroblasten-Medium

Das nachfolgende Protokoll dokumentiert die Herstellung des Kultivierungs-Mediums für die fibroblastische 3T6-Zelllinie.

Vorbereitung / Materialien

1. 1x Flasche 500 ml Gibco Dulbecco's Modified Eagle's Medium GlutaMAX High Glucose bereitstellen, nachfolgend als DMEM bezeichnet
2. 50 ml Biochrom FBS Superior 10% fetales Rinderserum (fetal bovine serum) bereitstellen, nachfolgend als FBS bezeichnet
3. 5 ml Gibco Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml 100x (enthält 10.000 U/ml Penicillin und 10.000 μ g/ml Streptomycin) bereitstellen, nachfolgend als PenStrep bezeichnet

Durchführung

1. 55 ml DMEM verwerfen
2. 50 ml des FBS hinzufügen und durch Auf- und Abpipettieren vermischen
3. 5 ml PenStrep hinzufügen und durch Auf- und Abpipettieren vermischen

Das Fibroblasten-Medium mit einem Volumen von 500 ml enthält anschließend 10% FBS sowie 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin.

10.2.3 Protokoll zur Herstellung von Differenzierungs-Medium

Das nachfolgende Protokoll dokumentiert die Herstellung des Differenzierungs-Mediums für die Versuchsdurchführung mit den osteoblastischen MC3T3-E1- und den fibroblastischen 3T6-Zellen.

Vorbereitung / Materialien

1. 1x steriles 250 ml Glasgefäß, nachfolgend als Glasgefäß bezeichnet
2. 1x Greiner Bio One CELLSTAR Zellkulturflasche mit einem Volumen von 250 ml (entspricht einer Wachstumsfläche von 75 cm²), nachfolgend als Zellkulturflasche bezeichnet
3. 1x Flasche 500 ml Fibroblasten-Medium (siehe **10.2.2 Protokoll zur Herstellung von Fibroblasten-Medium**), nachfolgend als Fibroblasten-Medium bezeichnet
4. 54,01 mg Sigma-Aldrich Glycerol-Phosphat (Molekulargewicht 216,04 g/mol; 54,01 mg Glycerol-Phosphat entsprechen einer Konzentration von 1 mM in 250 ml Medium), nachfolgend als Glycerol-Phosphat bezeichnet
5. 2,5 mg Sigma-Aldrich Ascorbinsäure (2,5 mg Ascorbinsäure entsprechen einer Konzentration von 10 µg/ml in 250 ml Medium), nachfolgend als Ascorbinsäure bezeichnet
6. 1x Sigma-Aldrich Spritzenvorsatzfilter (Corning syringe filter, mit einem Durchmesser von 28 mm und einer Porengröße von 0,2 µm), nachfolgend als Spritzenvorsatzfilter bezeichnet

Durchführung

1. 250 ml Fibroblasten-Medium entnehmen und in das Glasgefäß geben
2. 54,01 mg Glycerol-Phosphat hinzugeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischen
3. 2,5 mg Ascorbinsäure hinzugeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischen
4. Mit Hilfe des Spritzenvorsatzfilters das Medium filtern und in die Zellkulturflasche überführen

Das filtrierte Differenzierungs-Medium mit einem Volumen von 250 ml enthält anschließend 10% FBS, 1% L-Glutamin sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Glycerolphosphat und 10 µg/ml Ascorbinsäure.

10.2.4 Protokoll zum Auftauen von MC3T3-E1- respektive 3T3-Zellen

Das nachfolgende Protokoll dokumentiert den Auftau-Vorgang der in dieser Arbeit verwendeten kryokonservierten MC3T3-E1- und 3T6-Zellen.

Vorbereitung / Materialien

1. Kryokonservierte Zellen (MC3T3-E1- respektive 3T6-Zellen) im Kryoröhrchen (Cryovial) in Flüssigstickstoff respektive im -80° Kühlschrank (erhalten vom Leibniz Institut DSMZ), nachfolgend als Zellen bezeichnet
2. 37°-warmes Wasserbad, nachfolgend als Wasserbad bezeichnet
3. 15 ml Eppendorf-Gefäß (Corning centrifuge tube), nachfolgend als Eppendorf-Gefäß bezeichnet
4. 22 ml Osteoblasten-Medium respektive Fibroblasten-Medium (siehe **10.2.1 Protokoll zur Herstellung von Osteoblasten-Medium** beziehungsweise **10.2.2 Protokoll zur Herstellung von Fibroblasten-Medium**), nachfolgend als Medium bezeichnet
5. 1x Greiner Bio One CELLSTAR Zellkulturflasche mit einem Volumen von 550 ml (entspricht einer Wachstumsfläche von 175 cm²), nachfolgend als Zellkulturflasche bezeichnet

Durchführung

1. Zellkulturflasche mit Namen der Zelllinie (MC3T3-E1 respektive 3T6), Datum und Passage-Nummer (entspricht der Anzahl der Subkultivierungen; Zellen der Passage-Nummer 0 entsprechen direkt der Zell-Gewinnung aus Gewebe beziehungsweise aus Organismen; beim Auftau-Vorgang ergibt sich die Passage-Nummer 1) beschriften
2. Zellen aus dem Flüssig-Stickstoff respektive dem -80° Kühlschrank entnehmen und Kryoröhrchen im Wasserbad auftauen lassen
3. Kryoröhrchen mit Ethanol waschen und unter der Sicherheitswerkbank in das Eppendorf-Gefäß geben
4. In Abhängigkeit der aufzutauenden Zelllinie (MC3T3-E1 respektive 3T6) 10 ml Medium (Osteoblasten-respektive Fibroblasten-Medium) hinzugeben und durch Auf- und Abpipetieren vermischen
5. Eppendorf-Gefäß für 5 min bei 1200 rpm (entspricht 240x g) zentrifugieren
6. Medium-Überstand vorsichtig mit Pipette entfernen und das Zellpellet in 12 ml Medium (Osteoblasten-respektive Fibroblasten-Medium) resuspendieren
7. Zell-Medium-Suspension in Zellkulturflasche überführen und vorsichtig schütteln, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen beziehungsweise auszubreiten

Die aufgetauten Zellen in der Zellkulturflasche können nun im Begasungsbrutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert werden.

10.2.5 Protokoll zum Wechsel von Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Medium

Das nachfolgende Protokoll dokumentiert den Wechsel der in dieser Arbeit verwendeten Medium im Rahmen der Zellkultivierung. Hier wurde gemäß gängiger zellbiologischer beziehungsweise molekularbiologischer Standards im Umgang mit Zellkulturen in einem Zeitintervall von 2-3 Tagen der regelmäßige Wechsel der beiden Kulturmedien α MEM und DMEM durchgeführt.

Vorbereitung / Materialien

1. 1x Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Zellkulturflasche mit einem Volumen von 550 ml (entspricht einer Wachstumsfläche von 175 cm²), nachfolgend als Zellkulturflasche bezeichnet
2. 4 ml Biochrom phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphat buffered saline, 1x Konzentration), nachfolgend als PBS bezeichnet
3. 12 ml Osteoblasten-Medium respektive Fibroblasten-Medium (siehe **10.2.1 Protokoll zur Herstellung von Osteoblasten-Medium** beziehungsweise **10.2.2 Protokoll zur Herstellung von Fibroblasten-Medium**), nachfolgend als Medium bezeichnet

Durchführung

1. Medium aus Zellkulturflasche mittels Absaug-Glaspipette entfernen
2. 4 ml PBS hinzugeben und Zellkulturflasche damit vorsichtig ohne Ablösung der adhärennten Zellen waschen
3. PBS mittels Absaug-Glaspipette entfernen
4. 12 ml Medium (Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Medium) hinzugeben

Die Zellen in der Zellkulturflasche können nun in frischem Medium im Begasungsbrutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert werden.

10.2.6 Protokoll zur Sub-Kultivierung von MC3T3-E1- respektive 3T3-Zellen

Das nachfolgende Protokoll dokumentiert die Sub-Kultivierung der osteoblastischen MC3T3-E1-Zellen beziehungsweise der fibroblastischen 3T3-Zellen. Da sich die Passage-Nummer der Zellen bei jeder Sub-Kultivierung erhöht, wird dieser Vorgang auch als „Passagieren“ bezeichnet.

Vorbereitung / Materialien

1. 1x Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Zellkulturflasche mit einem Volumen von 550 ml (entspricht einer Wachstumsfläche von 175 cm²), Konfluenzgrad von ungefähr 70-80% erreicht, nachfolgend als Zellkulturflasche bezeichnet
2. 4 ml Biochrom phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphat buffered saline, 1x Konzentration), nachfolgend als PBS bezeichnet
3. 2 ml Biochrom Trypsin/EDTA-Lösung 0,05%/0,02% in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (1x Konzentration), nachfolgend als Trypsin/EDTA bezeichnet
4. 15 ml Eppendorf-Gefäß (Corning centrifuge tube), nachfolgend als Eppendorf-Gefäß bezeichnet
5. Ungefähr 80 ml Osteoblasten-Medium respektive Fibroblasten-Medium (siehe **10.2.1 Protokoll zur Herstellung von Osteoblasten-Medium** beziehungsweise **10.2.2 Protokoll zur Herstellung von Fibroblasten-Medium**), nachfolgend als Medium bezeichnet
6. 2-5x Greiner Bio One CELLSTAR Zellkulturflasche mit einem Volumen von 550 ml (entspricht einer Wachstumsfläche von 175 cm²), nachfolgend als Zellkulturflasche bezeichnet

Durchführung

1. Neue Zellkulturflasche mit Namen der Zelllinie (MC3T3-E1 respektive 3T3), Datum und Passage-Nummer beschriften
2. Medium aus Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Zellkulturflasche mittels Absaug-Glaspipette entfernen
3. 4 ml PBS hinzugeben und Zellkulturflasche damit vorsichtig ohne Ablösung der adhären Zellen waschen
4. PBS mittels Absaug-Glaspipette entfernen
5. 2 ml Trypsin/EDTA hinzugeben und für 3 min bei 37° im Begasungsbrutschrank inkubieren
6. Zellkulturflasche zur Ablösung randständiger Zellen leicht beklopfen, mikroskopische Validierung der Zell-Detachments
7. 6 ml Medium (Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Medium) hinzugeben um Trypsin-Wirkung zu neutralisieren
8. Durch Auf- und Abpipetieren Zell-Suspension generieren und in Eppendorf-Gefäß überführen
9. Eppendorf-Gefäß für 5 min bei 1200 rpm (entspricht 240x g) zentrifugieren
10. Überstand vorsichtig mit Pipette entfernen und das Zellpellet in 10 ml Medium (Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Medium) resuspendieren
11. Entsprechend des gewünschten Passagierungs-Verhältnisses zwischen 1:2 (folglich 5 ml der resuspendierten Zellen in 2 Zellkulturflaschen überführen, anschließend jeweils noch 7 ml Medium hinzugeben) und 1:5 (folglich 2 ml der resuspendierten Zellen in 5 Zellkulturflaschen überführen, anschließend jeweils noch 10 ml Medium hinzugeben) die Zell-Medium-Suspension in entsprechenden, beschrifteten Zellkulturflaschen überführen, mit Medium jeweils auf Gesamtvolumen von 12 ml auffüllen und vorsichtig schütteln, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen beziehungsweise auszubreiten

Die sub-kultivierten Zellen in der neu beschrifteten Zellkulturflaschen können nun in frischem Medium im Begasungsbrutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert werden.

10.2.7 Protokoll zur Ernte der MC3T3-E1- respektive 3T3-Zellen

In dem nachfolgenden Protokoll wird die Zell-Ernte der MC3T3-E1 und 3T3-Zellen ausführlich beschrieben.

Vorbereitung / Materialien

1. 1x Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Zellkulturflasche mit einem Volumen von 550 ml (entspricht einer Wachstumsfläche von 175 cm²), Konfluenzgrad von ungefähr 70-80% erreicht, nachfolgend als Zellkulturflasche bezeichnet
2. 4 ml Biochrom phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphat buffered saline, 1x Konzentration), nachfolgend als PBS bezeichnet
3. 2 ml Biochrom Trypsin/EDTA-Lösung 0,05%/0,02% in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (1x Konzentration), nachfolgend als Trypsin/EDTA bezeichnet
4. 15 ml Eppendorf-Gefäß (Corning centrifuge tube), nachfolgend als Eppendorf-Gefäß bezeichnet
5. Ungefähr 30 ml Osteoblasten-Medium respektive Fibroblasten-Medium (siehe **10.2.1 Protokoll zur Herstellung von Osteoblasten-Medium** beziehungsweise **10.2.2 Protokoll zur Herstellung von Fibroblasten-Medium**), nachfolgend als Medium bezeichnet
6. Neubauer-Zählkammer, Objektträger, Deckglas

Durchführung

1. Medium aus Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Zellkulturflasche mittels Absaug-Glaspipette entfernen
2. 4 ml PBS hinzugeben und Zellkulturflasche damit vorsichtig ohne Ablösung der adhärennten Zellen waschen
3. PBS mittels Absaug-Glaspipette entfernen
4. 2 ml Trypsin/EDTA hinzugeben und für 3 min bei 37° im Begasungsbrutschrank inkubieren
5. Zellkulturflasche zur Ablösung randständiger Zellen leicht beklopfen, mikroskopische Validierung der Zell-Detachments
6. 6 ml Medium (Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Medium) hinzugeben um Trypsin-Wirkung zu neutralisieren
7. Durch Auf- und Abpipetieren Zell-Suspension generieren und in Eppendorf-Gefäß überführen
8. Eppendorf-Gefäß für 5 min bei 1200 rpm (entspricht 240x g) zentrifugieren
9. Überstand vorsichtig mit Pipette entfernen und das Zellpellet in 10 ml Medium (Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Medium) resuspendieren
10. Zellzahl-Berechnung in der Neubauer-Zählkammer, Objektträger und Deckglas
 - a. 100 µl der Zelllösung aus 9. mit 900 µl Medium mischen (Verdünnungsfaktor 10)
 - b. 10 µl aus der Verdünnungsmischung auf Objektträger geben und mit Deckglas vorsichtig abdecken
 - c. In Neubauer-Zählkammer Zellen auszählen
 - d. Rechnung: Zellzahl * 10 („Neubauer-Koeffizient“) * 10 (Verdünnungsfaktor) ergibt die Anzahl der Zellen pro µl (Zellen/µl)
 - e. Multiplikation mit 10³ = 1000 ergibt die Zellen pro ml (Zellen/ml)
 - f. Multiplikation mit 10 ml (Resuspendierungsvolumen) ergibt die Zellen in der Resuspension

Es ergibt sich eine Gesamtzahl an Zellen in dem resuspendierten Volumen von 10 ml Medium (Osteoblasten- respektive Fibroblasten-Medium) mit einer spezifischen Konzentration an Zellen/ml, die über die Neubauer-Zählkammer berechnet wurde.

10.2.8 Protokoll zur Herstellung von Co-Kultivierungs-Gewebekulturschalen

Das nachfolgende Protokoll stellt eine Anleitung zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-Gewebekulturschalen dar. Nachfolgend ist dies für die Erzeugung eines einzelnen Zwei-Kompartimente-Co-Kultivierungs-Systems dargestellt.

Vorbereitung / Materialien

1. 1x Greiner Bio One CELLSTAR Gewebekulturschale 100 mm x 20 mm (Maximalvolumen 100 ml, Arbeitsvolumen 16-17 ml, Wachstumsfläche 58 cm²), nachfolgend als Vorlagen-Gewebekulturschale bezeichnet
2. 1x Greiner Bio One CELLSTAR Gewebekulturschale 100 mm x 20 mm (Maximalvolumen 100 ml, Arbeitsvolumen 16-17 ml, Wachstumsfläche 58 cm²), nachfolgend als Experiment-Gewebekulturschale bezeichnet
3. 1 g Zellkultur-gestestete Certified Megabase Agarose (Bio-Rad Laboratories GmbH), nachfolgend als Agarose bezeichnet
4. 25 ml Biochrom phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphat buffered saline, 1x Konzentration), nachfolgend als PBS bezeichnet
5. 1x Lineal beziehungsweise Geodreieck
6. 1x Einwegskalpell, 1x Stift zur Markierung des Trennbereiches

Durchführung

1. Auf der Unterseite der Vorlagen-Gewebekulturschale mittels Lineal 1,2 cm breiten, mittleren Trennbereich einzeichnen (siehe [2.2.4 Vorbereitung der Co-Kultivierung](#))
2. Mittels 25 ml PBS und 1 mg Agarose 4%igen Agarose-Lösung herstellen und in Mikrowelle vorsichtig bei 600 Watt erhitzen
3. 24 ml der erhitzten Agarose-Lösung in Vorlagen-Gewebekulturschale geben und gleichmäßig verteilen, dann vollständig abkühlen und vollständig aushärten
4. Mittels Einwegskalpell den an der Unterseite der Vorlagen-Gewebekulturschale eingezeichneten Trennbereich ausschneiden, welcher nachfolgend als Agarose-Divider bezeichnet wird
5. Agarose-Divider in die Mitte der Experiment-Gewebekulturschale überführen
6. Den Agarose-Divider mittels je 20-30 µl aus der verbliebenen, erneut erhitzten Agarose-Lösung an den vier Ecken des Agarose-Dividers in der Experiment-Gewebekulturschale fixieren beziehungsweise festkleben

Somit resultiert eine Co-Kultivierungs-Gewebeschale, die über den mittigen, 12 mm breiten Divider in zwei Kompartimente unterteilt ist. Da der Divider temporärer Natur ist, wird dieser im Verlauf der Co-Kultivierungs-Versuche entfernt. Dadurch erhält man drei Kompartimente: den Osteoblasten-Bereich, den Interface-Bereich und den Fibroblasten-Bereich

10.2.9 Protokoll zur Co-Kultivierung inklusive rhBMP7-Stimulation

Nachfolgend sind die Vorbereitungen, Materialien und einzelnen Schritte des Protokolls zur Co-Kultivierung der Osteoblasten und Fibroblasten in dem Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-System aufgelistet. Darüber hinaus werden auch die Schritte der rhBMP7-Stimulation und der Zell-Ernte beschrieben.

Vorbereitung / Materialien

1. 1x Zwei-Kammer-Co-Kultivierungs-System (siehe **10.2.8 Protokoll zur Herstellung von Co-Kultivierungs-Gewebekulturschalen**), nachfolgend als Gewebekulturschale bezeichnet
2. 2 ml MC3T3-E1-Zell-Lösung mit mit $1 \cdot 10^6$ Zellen (entspricht einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen), nachfolgend als Osteoblasten bezeichnet (siehe **10.2.7 Protokoll zur Ernte der MC3T3-E1- respektive 3T3-Zellen**)
3. 2 ml 3T3-Zell-Lösung mit mit $1 \cdot 10^6$ Zellen (entspricht einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen), nachfolgend als Fibroblasten bezeichnet (siehe **10.2.7 Protokoll zur Ernte der MC3T3-E1- respektive 3T3-Zellen**)
4. 16 ml Differenzierungs-Medium respektive Fibroblasten-Medium (siehe **10.2.3 Protokoll zur Herstellung von Differenzierungs-Medium**), nachfolgend als Medium bezeichnet
5. 2 ml Biochrom phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphat buffered saline, 1x Konzentration), nachfolgend als PBS bezeichnet
6. 3x Cell Scrapers 1,35 cm (Sarstedt AG & Co.), nachfolgend als Zellschaber bezeichnet
7. 3x 1,5 ml Eppendorf-Gefäß, nachfolgend als Eppendorf-Gefäß bezeichnet
8. 3x 600 µl RA1-Lyse-Buffer des RNA-Extraktions-Kits (siehe **10.2.10 Protokoll zur Extraktion und Purifikation genomischer RNA**), nachfolgend als Lyse-Puffer bezeichnet

Durchführung

1. Markierung der beiden Kompartimente der Gewebekulturschale auf der Unterseite mit OB (für Osteoblasten) und FB (für Fibroblasten), somit Kennzeichnung der Wachstumsbereiche der MC3T3-E1- und 3T3-Zellen
2. 2 ml Osteoblasten (entspricht $1 \cdot 10^6$ Zellen) in die OB-Seite der Gewebekulturschale aussäen
3. 2 ml Fibroblasten (entspricht $1 \cdot 10^6$ Zellen) in die FB-Seite der Gewebekulturschale aussäen
4. Inkubation der Zellen für 10 Minuten (zur Gewährleistung der fokalen Adhäsion der Zellen am Boden der Gewebekulturschale)
5. Hinzugabe von 6 ml Medium
6. Kultivierung der Osteoblasten und Fibroblasten für zwei Tage bis zu einer Konfluenz von ungefähr 70-80%
7. Absaugen des verbliebenen Mediums mittels Glaspipette sowohl aus dem Osteoblasten- als auch dem Fibroblasten-Bereich
8. Entfernung des Agarose-Dividers (und damit Freigabe der noch zellfreien Fläche für die Migration der Osteoblasten und Fibroblasten)
9. Hinzugabe von 10 ml Medium
10. Applikation von rhBMP7 in den untersuchten Konzentrationen von 0 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml, anschließend vorsichtig schwenken
11. Nach Erreichen der vordefinierten Zeitpunkten von 3 Tagen, 7 Tagen beziehungsweise 10 Tagen erfolgte die Zell-Ernte mit initialer Entfernung des Mediums mittels Glaspipette
12. Vorsichtiges Waschen mit 2 ml PBS (unter Schonung der adhäsiven Zellen, also unter Verhinderung der Zell-Ablösung)
13. Mittels Zellschaber behutsames Ablösen der Zellen aus dem Osteoblasten-Bereich, Resuspendierung im ersten Lyse-Puffer des RNA-Extraktions-Kits (siehe **10.2.10 Protokoll zur Extraktion und Purifikation genomischer RNA**), Aufsaugen mittels Pipette und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß geben
14. Mittels Zellschaber behutsames Ablösen der Zellen aus dem Fibroblasten-Bereich, Resuspendierung im ersten Lyse-Puffer des RNA-Extraktions-Kits (siehe **10.2.10 Protokoll zur Extraktion und Purifikation genomischer RNA**), Aufsaugen mittels Pipette und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß geben
15. Mittels Zellschaber behutsames Ablösen der Zellen aus dem Interface-Bereich, Resuspendierung im ersten Lyse-Puffer des RNA-Extraktions-Kits (siehe **10.2.10 Protokoll zur Extraktion und Purifikation genomischer RNA**), Aufsaugen mittels Pipette und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß geben

Somit liegen am Ende des Protokolls die Zellen aus dem Osteoblasten-, aus dem Fibroblasten- und aus dem Interface-Bereich vor, wobei diese bereits zur Vorbereitung der Extraktion der genomischen RNA im Lyse-Puffers des RNA-Extraktions-Kits vorliegen (siehe **10.2.10 Protokoll zur Extraktion und Purifikation genomischer RNA**).

10.2.10 Protokoll zur Extraktion und Purifikation genomischer RNA

Nachfolgend ist das Protokoll zur Extraktion und Reinigung der genomischen RNA aus den osteoblastischen Zellen und fibroblastischen Zellen genannt. Für die Aufreinigung und Purifikation des Transkriptoms der MC3T3-E1- und 3T3-Zellen kam das RNA-Isolations-Kit NucleoSpin RNA der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) zum Einsatz, wobei das Standardprotokoll des Extraktions-Kits aufgrund der erwarteten Menge an aus der Zell-Ernte gewonnenen Osteoblasten und Fibroblasten leicht abgewandelt angewendet wurde (Adaptierung der benötigten RA1-Lyse-Puffer-, β -Mercaptoethanol- und Ethanol-Volumina).

Vorbereitung / Materialien

1. 1x osteoblastische MC3T3-E1- beziehungsweise fibroblastische 3T3-Zellen, nachfolgend als Zellen bezeichnet, bereits in 600 μ l RA1-Lyse-Puffer vorliegen (siehe **10.2.9 Protokoll zur Co-Kultivierung inklusive rhBMP7-Stimulation**)
2. 6 μ l β -Mercaptoethanol
3. 1x Spritze mit 0,9 mm Kanüle (20 Gauge Durchmesser)
4. 1x NucleoSpin Filter
5. 2x 2 ml Eppendorf-Gefäß
6. 600 μ l 70% Ethanol
7. 1x NucleoSpin RNA Column
8. 350 μ l Membran Desalting Buffer, nachfolgend als MDB bezeichnet
9. 10 μ l rekonstituierte rDNase
10. 90 μ l Reaktions-Puffer
11. 200 μ l RAW2-Puffer
12. 850 μ l RA3-Puffer
13. 1x 1,5 ml Nuklease-freies Eppendorf-Gefäß
14. 20-60 μ l RNA-freies Wasser

Durchführung

1. Initial erfolgt die Präparation des Start-Materials und Homogenisierung der Probe
 - a. Den bereits in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorliegenden und in 600 μ l RA1-Lyse-Puffer suspendierten Zellen 6 μ l β -Mercaptoethanol hinzufügen
 - b. Suspension durch Auf- und Abpipetieren vermischen
2. Lyse der Zellen
 - a. Mehrmaliges Aufziehen (>5 Mal) der Zell-Suspension in einer Spritze zur Disruption der Zellen, Suspension wird nachfolgend als Zell-Lysat bezeichnet
3. Filtration des Zell-Lysats
 - a. NucleoSpin Filter auf 2 ml Eppendorf-Gefäß platzieren
 - b. Zell-Lysat auf Säule des NucleoSpin Filters geben
 - c. Eppendorf-Gefäß für 1 min bei 11.000x g zentrifugieren
 - d. NucleoSpin-Filter werfen
4. Adjustierung der RNA-Bindungs-Bedingungen
 - a. 600 μ l Ethanol zum filtrierten, homogenisierten Zell-Lysat (aus 3.) geben, durch Auf- und Abpipetieren vermischen (> 5 Mal)
5. Bindung der RNA
 - a. NucleoSpin RNA Column in neues 2 ml Eppendorf-Gefäß platzieren

- b. Zell-Lysat (aus 4.) mit maximal 750 µl auf Säule des Nucleo Spin RNA Column geben
 - c. Eppendorf-Gefäß für 30 s bei 11.000x g zentrifugieren
 - d. Falls Zell-Lysat-Volumen verblieben ist, die Prozedur wiederholen mit gleichem NucleoSpin RNA Column
6. Entsalzen der Silica-Membran
 - a. 350 µl MDB auf die Säule des Nucleo Spin RNA Column geben
 - b. Zur Trocknung der Silica-Membran Eppendorf-Gefäß für 1 min bei 11.000x g zentrifugieren
7. DNA-Verdau
 - a. 10 µl rekonstituierte rDNase und 90 µl Reaktions-Puffer vorsichtig mischen, nachfolgend als DNase-Reaktions-Mix bezeichnet
 - b. 95 µl des DNase-Reaktions-Mix auf die Mitte der Silica-Membran der NucleoSpin RNA Column (aus 6.) geben
 - c. Eppendorf-Gefäß mit DNA-Verdau-Reaktion für 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
8. Waschen und Trocknen der Silica-Membran
 - a. 200 µl RAW2-Puffer auf die NucleoSpin RNA Column geben (zur Inaktivierung der rDNase)
 - b. Eppendorf-Gefäß für 30 s bei 11.000x g zentrifugieren
 - c. Durchfluss verwerfen
 - d. 600 µl RA3-Puffer auf die NucleoSpin RNA Column geben
 - e. Eppendorf-Gefäß für 30 s bei 11.000x g zentrifugieren
 - f. Durchfluss verwerfen
 - g. 250 µl RA3-Puffer auf die NucleoSpin RNA Column geben
 - h. Eppendorf-Gefäß für 2 min bei 11.000x g zentrifugieren um die Silica-Membran vollständig zu trocknen
 - i. Durchfluss verwerfen
9. Eluieren der RNA
 - a. NucleoSpin RNA Column in ein neues, Nuklease-freies Eppendorf-Gefäß platzieren
 - b. Je nach gewünschter RNA-Konzentration 20-60 µl RNA-freies Wasser aus dem RNA-Extraktions-Kit auf die Säule der NucleoSpin RNA Column geben
 - c. Zur RNA-Eluierung von der Säule Eppendorf-Gefäß für 1 min bei 11.000x g zentrifugieren

Damit resultiert die aufgereinigte genomische RNA, die in einer Verdünnung von 60 µl RNA-freiem Wasser vorliegt. Je nach Quantifizierung der RNA-Konzentration sollte ein RNA-Zielvolumen von 20-60 µl gewählt werden.

10.2.11 Protokoll zur photometrischen Bestimmung der Konzentration genomischer RNA

Die einzelnen Schritte der photometrischen Quantifizierung der RNA-Konzentration sind im nachfolgenden Protokoll ausführlich aufgelistet. Im Anschluss an die RNA-Extraktion erfolgte eine photometrische Quantifizierung dieser Nukleinsäuren mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Mikrovolumen-Spektralphotometer (Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland).

Vorbereitung / Materialien

1. 1x Probe der aufgereinigten, genomischen RNA (siehe **10.2.10 Protokoll zur Extraktion und Purifikation genomischer RNA**), nachfolgend als Gesamt-RNA bezeichnet

Durchführung

1. 1 µl der Gesamt-RNA auf die Messeinheit des Photometers geben
2. Mittels der proprietären Geräte-Software photometrische Konzentrations-Bestimmung, Messung der OD₂₃₀, OD₂₆₀ und OD₂₈₀-Werte zur Bestimmung des A₂₆₀/A₂₈₀- und des A₂₆₀/A₂₃₀-Quotienten

Somit ergeben sich einerseits die RNA-Konzentration der genomischen RNA-Probe und andererseits eine Aussage über das Vorliegen beziehungsweise den Grad einer Proteinkontamination (A₂₆₀/A₂₈₀-Quotient) beziehungsweise einer Verunreinigung mit Polysacchariden oder Peptiden (A₂₆₀/A₂₃₀-Quotient).

10.2.12 Protokoll zur Erstellung von cDNA aus genomischer RNA

Die Durchführung der Reverse Transkriptase-PCR, kurz RT-PCR, wird nachfolgend in protokollarischer Form dargestellt. Dabei fand das Kit iScript cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) zur cDNA-Synthese Verwendung.

Im Hersteller-Protokoll sind für den Einsatz von 1 µg RNA ein maximales Volumen von 15 µl erlaubt, was eine minimale RNA-Konzentration von 66,67 µl/ml entspricht. Da dieser Wert für einige RNA-Proben aus der vorliegenden Arbeit unterschritten wurde, erfolgte die Anpassung des Protokolls. So wurde das Gesamtvolumen auf 40 µl hochskaliert, womit ein RNA-Volumen von maximal 30 µl eingesetzt werden konnte, um die Zielmenge von 1 µg beziehungsweise 1000 ng RNA zu erreichen.

Zur Generierung der cDNA wurde ein FlexCycler mit Twinblock 48-Thermalblock eingesetzt (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland).

Vorbereitung / Materialien

1. 1x Probe der aufgereinigten, genomischen RNA (siehe **10.2.10 Protokoll zur Extraktion und Purifikation genomischer RNA**), nachfolgend als Gesamt-RNA bezeichnet
2. 1x 0,2 ml Eppendorf-Gefäß für PCR, nachfolgend als PCR-Gefäß bezeichnet
3. 8 µl iScript Reaktions-Mix
4. 2 µl iScript Reverse Transkriptase
5. Bis zu 30 µl Nuklease-freis Wasser

Durchführung

1. Berechnung des Volumens der einzusetzenden Gesamt-RNA (Zielvolumen: 1 µg = 1000 ng RNA, Konzentrations-Messung siehe **10.2.11 Protokoll zur photometrischen Bestimmung der Konzentration genomischer RNA**), nachfolgend als RNA-Volumen bezeichnet
2. Berechnung des Volumens an Nuklease-freiem Wasser (40 µl Gesamtvolumen – 8 µl iScript Reaktions-Mix – 2 µl iScript Reverse Transkriptase – RNA-Volumen), nachfolgend als Wasser-Volumen bezeichnet
3. 8 µl iScript Reaktions-Mix in PCR-Gefäß geben
4. RNA-Volumen in das PCR-Gefäß geben
5. Wasser-Volumen in das PCR-Gefäß geben (zum Auffüllen auf Gesamt-Volumen von 40 µl)
6. 2 µl iScript Reverse Transkriptase in das PCR-Gefäß geben

7. RT-PCR-Protokoll für FlexCycler

5 min bei 25°
30 min bei 42°
5 min bei 85°
Halt bei 4°

Es ergibt sich eine aus genomischer RNA umgeschriebene cDNA-Probe, die in den weiteren Schritten verdünnt und zur qRT-PCR-Analyse eingesetzt wurde.

10.2.13 Protokoll zur Verdünnung der cDNA

Das nachfolgende Protokoll beschreibt die einzelnen Schritte zur Verdünnung der cDNA-Proben, die aus dem vorherigen Unterkapitel gewonnen wurden.

Vorbereitung / Materialien

1. 1x cDNA-Ansatz im 0,2 ml Eppendorf-PCR-Gefäß (siehe **10.2.12 Protokoll zur Erstellung von cDNA aus genomischer RNA**)
2. 1x 0,2 ml Eppendorf-Gefäß für PCR, nachfolgend als PCR-Gefäß bezeichnet
3. 60 µl Nuklease-freies Wasser

Durchführung

1. 20 µl des cDNA-Ansatzes in das neue PCR-Gefäß pipettieren
2. 60 µl Nuklease-freies Wasser hinzugeben, durch Auf- und Abpipettieren vermischen

Das neue Eppendorf-PCR-Gefäß enthält 80 µl Volumen in einem Mischungsverhältnis von 1:3 beziehungsweise mit einem Verdünnungsverhältnis von 1:4.

10.2.14 Protokoll zur Durchführung der qRT-PCRs

Die Planung und Durchführung der quantitativen real-time-PCRs, kurz qRT-PCRs, sind in dem nachfolgenden Protokoll festgehalten. Hierzu wurde das Kit SsoFast EvaGreen Supermix der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) verwendet.

Die PCR-Platten-Schemata beziehungsweise PCR-Platten-Designs sind im Abschnitt **10.1.8 Ergebnisse des PCR-Platten-Designs für die qRT-PCR-Durchführung** detailliert beschrieben. Zur pRT-PCR-Durchführung wurde der Thermozykler des Modells CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet.

Vorbereitung / Materialien

1. 1 µl cDNA-Ansatz (siehe **10.2.13 Protokoll zur Verdünnung der cDNA**)
2. 1x 96-Schacht-Mikrotiter-PCR-Platte (96 well pcr plate), nachfolgend PCR-Platte genannt

3. 10 µl SsoFast EvaGreen Supermix
4. 2 µl Vorwärts-Primer (forward primer), nachfolgend als Primer 1 bezeichnet
5. 2 µl Rückwärts-Primer (reverse primer), nachfolgend als Primer 2 bezeichnet
6. 7 µl RNase- / DNase-freies Wasser

Durchführung

1. 10 µl SsoFast EvaGreen Supermix in einen Schacht der PCR-Platte geben
2. 2 µl Primer 1 in gleichen Schacht zugeben
3. 2 µl Primer 2 in gleichen Schacht zugeben
4. 1 µl cDNA-Ansatz in gleichen Schacht zugeben
5. qRT-PCR-Protokoll für Thermozykler (vom Hersteller für cDNA empfohlene, optimierte Thermozykler-Konditionen)

1. Schritt: Enzym-Aktivierung bei 98° C für 2 min
2. Schritt: 30-40 Zyklen mit
a. Denaturierung bei 95° C für 5 s
b. Annealing und Elongation bei 60° C für 5 s
c. Schmelzkurve bei 65-95° (inkrementell in 0,5° C-Schritten mit 5 s pro Schritt)

Die über die proprietäre Thermocycler-generierten Daten können zur weiteren statistischen Analyse verwendet werden.

11. Tabellarischer Lebenslauf

Der tabellarische Lebenslauf wurde zum Schutz personenbezogener Daten für die elektronisch publizierte Version entfernt.

12. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Nachfolgend sind die akademischen Lehrerinnen und Lehrer in lexikographischer Ordnung aufgelistet.

Nummer	Akademische Lehrerinnen / Lehrer	Nummer	Akademische Lehrerinnen / Lehrer
1.	Dr. Jürgen Adamkiewicz	2.	Prof. Dr. Detlef Bartsch
3.	Prof. Dr. Erika Baum	4.	Priv.-Doz. Dr. Klaus Baumann
5.	Prof. Dr. Annette Becker	6.	Prof. Dr. Stephan Becker
7.	Priv.-Doz. Dr. Michael Bette	8.	Prof. Dr. Stefan Bösner
9.	Prof. Dr. Benjamin Bücking	10.	Prof. Dr. Andreas Burchert
11.	Prof. Dr. Yalcin Cetin	12.	Prof. Dr. Frank Czubayko
13.	Prof. Dr. Jürgen Daut	14.	Dr. Wolfgang Dersch
15.	Prof. Dr. Nobert Donner-Banzhoff	16.	Prof. Dr. Turgay Efe
17.	Priv.-Doz. Dr. Bilal Farouk El-Zayat	18.	Prof. Dr. Volker Fendrich
19.	Dr. Ingo Fischer	20.	Prof. Dr. Michael Frink
21.	Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann	22.	Prof. Dr. Christian Görg
23.	Prof. Dr. Thomas Gress	24.	Prof. Dr. Michael Hertl
25.	Priv.-Doz. Dr. Helmut Höffken	26.	Prof. Dr. Rainer Hofmann
27.	Prof. Dr. Joachim Hoyer	28.	Prof. Dr. Walter Hundt
29.	Dr. Andreas Jerrentrup	30.	Prof. Dr. Dr. Peter Herbert Kann
31.	Prof. Dr. Clemens Kill	32.	Prof. Dr. Ralf Kinscherf

Nummer	Akademische Lehrerinnen / Lehrer	Nummer	Akademische Lehrerinnen / Lehrer
33.	Prof. Dr. Tilo Kircher	34.	Prof. Dr. Andreas Rembert Koczulla
35.	Prof. Dr. Ulrich Koehler	36.	Prof. Dr. Arne König
37.	Prof. Dr. Klaus Jochen Klose	38.	Prof. Dr. Jan Koolman
39.	Prof. Dr. Christian Kühne	40.	Prof. Dr. Philipp Lechler
41.	Prof. Dr. Roland Lill	42.	Prof. Dr. Michael Lohoff
43.	Dr. Ulrich Lüsebrink	44.	Prof. Andreas Mahnken
45.	Prof. Dr. Rolf Maier	46.	Prof. Dr. Bernhard Maisch
47.	Dr. Katja Maschuw	48.	Dr. Stephan Metzelder
49.	Dr. Christian Meyer	50.	Prof. Dr. Roland Moll
51.	Prof. Dr. Rainer Moosdorf	52.	Prof. Dr. Ulrich Mueller
53.	Prof. Dr. Reinier Mutters	54.	Prof. Dr. Christopher Nimsy
55.	Prof. Dr. Andreas Neff	56.	Prof. Dr. Andreas Neubauer
57.	Prof. Dr. Wolfgang Oertel	58.	Prof. Dr. Dominik Oliver
59.	Prof. Dr. Axel Pagenstecher	60.	Prof. Dr. Timothy David Plant
61.	Prof. Dr. Harald Renz	62.	Prof. Dr. Gerd Richter
63.	Prof. Dr. Klaus-Heinrich Röhm	64.	Prof. Dr. Steffen Ruchholtz
65.	Priv.-Doz. Dr. Christian Peterlein	66.	Prof. Dr. Wolfgang Pfützner
67.	Priv.-Doz. Dr. Regina Preisig-Müller	68.	Prof. Dr. Irmtraut Sahmland
69.	Prof. Dr. Helmut Schäfer	70.	Prof. Dr. Bernhard Schieffer

Nummer	Akademische Lehrerinnen / Lehrer	Nummer	Akademische Lehrerinnen / Lehrer
71.	Dr. Ulrich Schu	72.	Prof. Dr. Walter Sekundo
73.	Dr. Selim Sevinc	74.	Priv.-Doz. Dr. Frank Sommer
75.	Prof. Dr. Birte Steiniger	76.	Dr. Zaher Swaid
77.	Priv.-Doz. Dr. Björn Tackenberg	78.	Prof. Dr. Claus Franz Vogelmeier
79.	Prof. Dr. Sebastian Vogt	80.	Prof. Dr. Uwe Wagner
81.	Prof. Dr. Eberhard Weihe	82.	Prof. Dr. Jochen Werners
83.	Priv.-Doz. Dr. Rainer Westermann	84.	Dr. Ellen Wollmer
85.	Dr. Christian Wrocklage	86.	Prof. Dr. Hinnerk Wulf
87.	Prof. Dr. Michael Zemlin	88.	Dr. Ewgeni Ziring

13. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Steffen Ruchholtz für die Überlassung des Dissertations-Themas und für seine Unterstützung und Betreuung. Neben seinem akademischen Rat sowohl in methodischer als auch inhaltlicher Hinsicht haben seine Anregungen und kritischen Kommentare maßgeblich zum Ertablierung des Zwei-Kammer-Co-Kultivierungsmodelles auch als zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen!

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich und ausdrücklich einerseits bei Herrn Prof. Dr. med. Philipp Lechler und andererseits bei Herrn Dr. med. Tim Schwarting bedanken. Ich danke einerseits für die unermüdliche Betreuung, die konstruktive Unterstützung selbst zu ungewöhnlichen Tageszeiten und andererseits sowohl für die detaillierte Beratung in inhaltlichen, methodischen Belangen als auch bei Formatierungsfragen.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Nahed El-Najjar und Herrn Dr. rer. nat. René Zimmermann. Ohne diese Personen wäre die Umsetzung des methodischen Ansatzes nicht möglich gewesen, darüber hinaus bin ich sehr dankbar für die unermüdliche Unterstützung, Beratung und Betreuung des Projektes beginnend von der ersten Idee einer Co-Kultivierung von Zellen bis hin zur Verfassung der hier vorliegenden Arbeit.

Genauso danke ich Florian Krause, Pia Jansen und Katharina Eisoldt. Danke für eure Unterstützung, eure Erfahrung und alle Hilfestellungen im Labor und im Umgang mit Zellkulturen und molekularbiologischen Methoden.

Meinen Dank gebührt darüber hinaus meinen Eltern Rita und Josef Benölken. Danke für den Rückhalt, für alle offenen Ohren und auch für die notwendige Motivation in Momenten, in denen ich es gebraucht habe. Danke ebenso dafür, dass ihr immer für mich da seid, in guten aber in weniger guten Momenten meines Lebens. Danke für eure immer liebevolle Unterstützung, und euer Vertrauen in mich!

Ich möchte Danke sagen an meinem Zwillingbruder Alexander Benölken. Vielen Dank dir für deine Unterstützung, deine Motivation und deine Hilfe nicht nur in Bezug auf diese Arbeit, sondern viel mehr in meinem gesamten Leben. Dist du der beste Bruder, den ich mir vorstellen kann und ein Leben ohne dich wäre nur halb so lustig!

Natürlich möchte ich mich bei meiner Frau Janina Pado ganz herzlich und mit Ausdruck bedanken! Danke für deine unermüdliche Hilfe, deine Rücksicht und dafür, dass du mir immer mal wieder den nötigen Motivationsschub geben konntest und mich zeitgleich für die noch so kleinsten Fortschritte mit deinem strahlend schönen Lächeln belohnt hast. Vielen Dank für deine Geduld mit mir, für deine Korrekturvorschläge und Ratschläge und auch für deine immense Hilfe in anderen Bereichen meines Lebens! Danke, dass es dich gibt, du bist einzigartig für mich und in dir habe ich nicht nur die Traumfrau fürs Leben, sondern auch meinen besten Freund gefunden!

Zuletzt möchte ich selbstverständlich noch allen danken, die ich hier vergessen oder nicht einzeln aufgeführt habe. Danke an meine Freunde in Bielefeld, Marburg und Böblingen, an meine Arbeitskollegen und an meine früheren Kollegen. Ich danke euch, dass ich so manchen Frust, der sich im Laufe der Verfassung dieser Arbeit angesammelt hat, an euch auslassen konnte. Danke zudem für eure Rücksicht und eure Unterstützung!

14. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Entwicklung und Etablierung eines auf sekundären, murinen Osteoblasten und Fibroblasten beruhenden Co-Kultur-Modells zur genomischen Analyse von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und Evaluierung dieser neuen Methode am Beispiel des Bone Morphogenetic Proteins 7

in dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg (Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med Steffen Ruchholtz) unter der Leitung von:

Prof. Dr. med. Philipp Lechler

mit Unterstützung durch:

Prof Dr. med. Steffen Ruchholtz, Dr. med. Tim Schwarting,
Dr. rer. nat. René Zimmermann, Dr. rer. nat. Nahed El-Najjar

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

- Schwarting, T., Benölken, M., Ruchholtz, S., Frink, M., Lechler, P. (2015). *Bone morphogenetic protein-7 enhances bone-tendon integration in a murine in vitro co-culture model*. International orthopaedics, Band 39, Auflage 4, Seite 799-805.

Ort, Datum

Michael Pado, geb. Benölken

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

Ort, Datum

Prof. Dr. med. Philipp Lechler (Referent)